

**Die Myoblastenfusion zur Entstehung der glatten
Testismuskulatur ist abhängig von Duf und Rst
wobei die embryonale Myogenese unabhängig von
Argininkinase abläuft**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jessica Kuckwa, M.Sc.
aus Merseburg (Saale)

Marburg, 2017

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)
als Dissertation angenommen am: 25.04.2017

Erstgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2017

Teile der Arbeit wurden in folgenden Arbeiten veröffentlicht:

J. Kuckwa, K. Fritzen, D. Buttgereit, S. Rothenbusch-Fender, R. Renkawitz-Pohl (2016): A new level of plasticity: *Drosophila* smooth-like testes muscles compensate fusion-defects; Development; 143(2): 329-38

L. Susic-Jung, C. Hornbruch-Freitag, J. Kuckwa, K.-H. Rexer, U. Lammel, R. Renkawitz-Pohl (2012): Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of *Drosophila melanogaster*; Developmental Biology 370: 86-97

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
3.1. Determination und Differenzierung der Muskulatur im Embryo	3
3.2. Die Entstehung der larvalen somatischen Muskulatur im Embryo	4
3.2.1. Im Embryo können zwei Phasen der Myoblastenfusion unterschieden werden	4
3.2.2. Die Zellfusion wird durch die Adhäsion der Myoblasten und die Entstehung eines Signalzentrums eingeleitet	5
3.2.3. Die Zelladhäsion induziert eine komplexe Signaltransduktion, die zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts führt	7
3.3. Phosphagene können als Energie-Puffer agieren und sind evolutionär konserviert	9
3.4. Während der Metamorphose kommt es zur Umstrukturierung der Muskulatur	11
3.5. Die Entwicklung des männlichen Reproduktionstrakts	12
3.6. Ziele der Arbeit	14
4. Material und Methoden	15
4.1. Materialien	15
4.1.1. Geräte	15
4.1.2. Chemikalien	15
4.1.3. Verwendungsfertige Lösungen, Enzyme und Kits	16
4.1.4. Lösungen, Puffer und Medien	17
4.1.5. cDNAs und Vektoren	20
4.1.6. Synthetische Oligonukleotide	20
4.1.7. Sequenzierung	21
4.1.8. Generierte Konstrukte	21
4.1.9. Antikörper, Seren und Farbstoffe	22
4.1.10. Bakterienstämme	23
4.1.11. <i>Drosophila melanogaster</i> Fliegenlinien	24
4.1.12. Sonstige Materialien	25
4.1.13. verwendete Internet-Ressourcen und spezielle Software	25
4.2. Molekularbiologische Methoden	25
4.2.1. Isolation genomischer DNA	25
4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26

4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	27
4.2.4. Aufreinigung von PCR-Produkten	27
4.2.5. Ligation von PCR-Produkten in TOPO [®] -Vektoren	27
4.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten aus dem pENTR [™] /D-TOPO [®] -Vektor in „Gateway“- Vektoren	28
4.2.7. Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Zellen	28
4.2.8. Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation).....	28
4.2.9. Isolation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad im präparativen Maßstab (Midipräparation)	29
4.2.10. Isolation von Gesamt-RNA aus Myoblasten von Genitalscheiben	29
4.2.11. Herstellung von RNA-Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen.....	30
4.2.12. Überprüfung der RNA-Sonden mittels Spot-Test	31
4.2.13. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	31
4.3. Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	31
4.3.1. Zucht und Haltung von Stämmen.....	31
4.3.2. Überprüfung der Fertilität adulter Fliegen	32
4.3.3. Auswahl von Puppen definierten Alters.....	32
4.3.4. Präparation von adulten oder pupalen männlichen Reproduktionssystemen	32
4.3.5. Immunfluoreszenz-Analysen an pupalen oder adulten männlichen Reproduktionstrakten	32
4.3.6. Nachweis von DNA-Replikation in Puppen mittels EdU-Injektion.....	33
4.3.7. F-Aktin Nachweis mit Phalloidin und DNA-Färbung.....	33
4.3.8. <i>ex vivo</i> Kultur von pupalen Genitalscheiben und Testes.....	34
4.3.9. Sammeln von Fliegenembryonen	34
4.3.10. Entfernen des Chorions von Embryonen.....	34
4.3.11. Fixieren von Embryonen mit Formaldehyd	34
4.3.12. Immunhistologische Färbung an Embryonen nach der ABC-Methode	35
4.3.13. Fluoreszente immunhistologische Färbung an Embryonen	35
4.3.14. <i>in situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	35
4.3.15. Fluoreszente <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) an Embryonen mit kombiniertem Immunofluoreszenz-Antikörpernachweis	36
4.3.16. Herstellung von Embryonen-Dauerpräparaten mit Epon	37
5. Ergebnisse	38

5.1. Analyse von Argk im Hinblick auf eine Funktion während der embryonalen Myogenese ..	38
5.1.1. Argk wird in der somatischen Muskulatur exprimiert	38
5.1.1.1. Zwei Proteintrap-Linien weisen auf eine Expression von Argk in der somatischen Muskulatur hin	38
5.1.1.2. Ein ektopisch exprimiertes Argk-Konstrukt lokalisiert an den Mitochondrien der somatischen Muskulatur.....	39
5.1.2. Die embryonale Myogenese verläuft unabhängig von Argk.....	41
5.1.2.1. <i>argk</i> wird unabhängig vom Voranschreiten der Myogenese transkribiert.....	41
5.1.2.2. Die Lokalisation des Argk-Myc Fusionsproteins in Embryonen mit beeinträchtigter Myoblastenfusion ist vergleichbar zum Wildtyp	42
5.1.2.3. Deletion, Über-Expression oder das Einbringen einer dominant-negativ wirkenden Proteinvariante von Argk führt nicht zu Defekten in der Muskelentwicklung	44
5.2. Die Entstehung der Muskelschichten des männlichen Reproduktionssystems am Beispiel der Testismuskulatur	47
5.2.1. Die inneren Organe des männlichen Reproduktionstrakts sind umgeben von verschieden gestalteten Muskelschichten.....	47
5.2.2. Im männlichen Reproduktionssystem sind einkernige und mehrkernige Muskelfasern zu finden.....	48
5.2.3. Testis-Myoblasten amplifizieren auf der Genitalscheibe und migrieren als mehrkernige Zellen auf den Testis	50
5.2.3.1. Die Menge der Myoblasten auf der Genitalscheibe nimmt im Verlauf der Metamorphose deutlich zu, bevor die Muskelvorläufer auf die Testes migrieren.....	50
5.2.3.2. Die Myoblasten auf der frühen Genitalscheibe sind mitotisch aktiv	53
5.2.3.3. Alle auf den Testis migrierenden Muskelzellen sind bereits mehrkernig.....	54
5.2.3.4. Die Muskulatur des Testis wird durch Myoblastenfusion mehrkernig.....	56
5.2.4. Vor dem Auftreten der Myoblastenfusion werden Anhäufungen von Aktin beobachtet.	57
5.2.5. RNA lässt sich spezifisch aus Genitalscheiben-Myoblasten isolieren	58
5.2.6. Adhäsionsmoleküle der embryonalen Myogenese werden bei der Entstehung der Testismuskulatur exprimiert und sind funktionell relevant.....	59
5.2.6.1. Die Adhäsionsmoleküle <i>duf</i> und <i>sns</i> werden während der Entwicklung der Testismuskulatur transkribiert.....	59

5.2.6.2. RNAi-vermittelter Knock-down einiger Zelladhäsionsmoleküle führt zu Defekten in der Testismuskelhülle.....	62
5.2.6.3. Die Verminderung des Duf- und/oder Rst-Levels in Myoblasten führt zu einer geringeren Kernzahl in Testismuskeln.....	63
5.2.6.4. Die Entwicklung des männlichen Reproduktionstrakts und das Voranschreiten der Spermatogenese erscheint trotz Reduktion der Fusionseffizienz wie im Wildtyp.....	66
5.2.6.5. Trotz reduzierter Kernzahl entsteht ein wildtypisches Muskelmuster mit normaler Anordnung der Filamente in den adulten Testes.....	70
6. Diskussion.....	72
6.1. Der Einfluss von Argk auf die embryonale Myoblastenfusion.....	72
6.2. Die Muskulatur des männlichen Reproduktionssystems fusioniert abhängig von Duf und Rst	74
6.2.1. Die Muskulatur des männlichen Reproduktionstrakts weist Ähnlichkeiten zu verschiedenen bisher beschriebenen Muskeln auf	74
6.2.2. Die Testis-Myoblasten werden auf der Genitalscheibe determiniert und migrieren erst nach der Fusion auf die Testes	76
6.2.3. Die glatte Testismuskulatur entsteht durch Zell-Zell-Fusion.....	79
6.2.4. Testis-Myoblasten sind eine heterogene Population mit FC- und FCM-artigen Zellen, bei deren Fusion es keine Hinweise auf die Ausbildung von FuRMAS gibt.....	79
6.2.5. Die Fusion ist begrenzt auf die anterioren Spitzen der entstehenden Samenblasen.....	81
6.2.6. Bei der Bildung der Testismuskulatur könnten Duf und Rst unabhängig voneinander agieren	82
6.2.7. In Testismuskeln mit reduzierter Zellkern-Anzahl kommt es zu korrekter Filament-Organisation, Formgebung der Testes und männlicher Fertilität.....	83
6.2.8. Ausblick.....	84
7. Literatur.....	86
8. Anhang	98
8.1. Abkürzungsverzeichnis	98
8.2. Insertionsorte der Proteintrap-P-Elemente in der genomischen Region	100
8.2.1. <i>Trol</i> gene region: bp 26.901 bis bp 27.500.....	100
8.2.2. <i>Argk</i> gene region: bp 7601 bis bp 9000.....	100
8.3. Alignment der potentiellen Argininkinasen von <i>Drosophila</i>	101
8.4. <i>Argk</i> ist das einzige während der embryonalen Myogenese spezifisch im somatischen und viszerale Mesoderm transkribierte Phosphagen-Gen im <i>Drosophila</i> Genom.....	102

8.5. Übersicht <i>argk</i> -defizienter Fliegenlinien	103
8.6. Benötigte Zeit für die pupale Entwicklung bei verschiedenen Umgebungstemperaturen	
.....	104
8.7. Expressionsmuster des Gal4-Treibers C855a	105
8.8. Trol ist in Genitalscheiben nachweisbar	106
8.9. Weitere Publikationen	107
Danksagung	108
Erklärung	109
Lebenslauf	110

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die larvale Muskulatur von *Drosophila* entsteht durch die heterotypische Fusion von Myoblasten im Embryo. Durch die Adhäsion der fusionierenden Zellen wird eine Signalkaskade aktiviert, die Aktin-Reorganisationsprozesse anstößt und in der Auflösung der Membranen resultiert. Für diesen Prozess muss in kurzer Zeit viel Energie bereitgestellt werden. Es wurde vermutet, dass Argininkinase (Argk) die Energieversorgung der Myoblastenfusion unterstützt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Argk in der embryonalen Muskulatur während der Myoblastenfusion exprimiert wird und zum Teil mit Mitochondrien kolokalisiert. Analysen von Deletions-Linien, ektopisch exprimierten Argk-Varianten sowie Lokalisationsstudien weisen darauf hin, dass Argk keine essentielle Funktion bei der embryonalen Myoblastenfusion übernimmt.

Auch während der Metamorphose finden Myogenese-Prozesse statt. Die larvale Muskulatur wird dabei durch adulte Muskeln wie z.B. Bein- und Flugmuskeln ersetzt. Die Muskulatur der weiblichen und männlichen Reproduktionsorgane wird neugebildet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Muskulatur des männlichen Reproduktionstraktes insbesondere im Hinblick auf die Entstehung der Testismuskulatur untersucht. Die inneren Organe des männlichen Reproduktionstraktes sind von Muskelschichten umgeben, die unterschiedlich gestaltet sind. Die Muskelschicht der Testes unterscheidet sich von allen anderen in *Drosophila* beschriebenen Muskeln: eine Schicht aus glatten, mehrkernigen Muskelfasern umhüllt das Organ vollständig. Es wurde gezeigt, dass sich die Testis-Myoblasten zu Beginn der Metamorphose auf der Genitalscheibe befinden, dort amplifizieren und fusionieren, bevor sie mehrkernig als naszierende Myotuben auf die Testes migrieren. An der Fusion der Testis-Myoblasten sind die Adhäsionsmoleküle Dumbfounded (Duf) und Roughest (Rst) beteiligt, die während der embryonalen Myogenese die Adhäsion der Myoblasten gewährleisten. Bei einem Knock-down von *duf*, *rst* und *duf + rst* gemeinsam durch RNA-Interferenz entstehen Testismuskeln, die über weniger Zellkerne als der Wildtyp verfügen. Dabei sind die Filamentanordnung und die Migration der naszierenden Myotuben von der Genitalscheibe auf die Testes unverändert, so dass die adulten männlichen Reproduktionstrakte trotz verminderter Fusionseffizienz vom Wildtyp nicht zu unterscheiden sind. Daher wird postuliert, dass eine verminderte Fusionsrate spezifisch in den Testismuskeln kompensieren wird.

2. SUMMARY

The larval musculature of *Drosophila* arises by heterotypic fusion of myoblasts. A signaling cascade is activated by adhesion of fusing cells and leads to actin rearrangements as well as membrane break down. For this process, an extensive amount of energy must be provided in a short time. It was assumed that arginine kinase (Argk) supports the energy supply of myoblast fusion. It was demonstrated in the course of this thesis that Argk is expressed in embryonic musculature during myoblast fusion and colocalizes partially with mitochondria. Yet, analyses of deletion lines, ectopically expressed protein variants as well as localization studies indicate that Argk does not fulfill an essential function in embryonic myoblast fusion.

During metamorphosis, further processes of myogenesis occur. The larval musculature is replaced by adult muscles e.g. leg and flight muscles. The musculature of the female and male reproductive tract is newly formed. In the course of this thesis, the musculature of the male reproductive tract was analyzed particularly with regard to the development of the testis musculature. The inner organs of the male reproductive tract are encircled by muscle sheaths with different properties. The muscle sheaths of the testes differ from all other muscles previously described in *Drosophila*: smooth, multinuclear muscle fibers enclose the organ entirely. It was demonstrated that the testis myoblasts are located on the genital disc at the beginning of metamorphosis, amplify and fuse before migrating as multinuclear nascent myotubes onto the testes. The adhesion molecules Dumbfounded (Duf) and Roughest (Rst), assuring adhesion of myoblasts in embryonic myogenesis, are involved in fusion of the testis myoblasts as well. In a knock-down of *duf*, *rst* and *duf* + *rst* together mediated by RNA interference, testis muscles with fewer nuclei than the wild type are developing. Filament arrangement and migration of the nascent myotubes from genital disc onto the testes are not affected. Despite reduced fusion efficiency, the adult male reproductive tracts do not differ from the wild type. Therefore, it is postulated that reduced fusion rates are compensated specifically in the testis muscles.

3. EINLEITUNG

Die Entstehung von Muskulatur ist ein sehr konservierter Prozess. Zahlreiche Studien in Vertebraten und dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* weisen auf Gemeinsamkeiten bei der Myoblastenfusion hin, konnten aber bisher die genauen Mechanismen nicht vollständig aufklären.

Die verschiedenen Muskeln einer Fliege unterscheiden sich stark voneinander. So gibt es einkernige oder synzytiale Muskeln und tubuläre sowie fibrilläre Muskeln. Diese sehr unterschiedlich gestaltete Muskulatur entsteht zu verschiedenen Zeitpunkten im Lebenszyklus auf unterschiedliche Weise. Die Entstehung der mehrkernigen Körperwandmuskulatur während der Embryonalentwicklung, insbesondere die dabei stattfindende Fusion der Myoblasten, war und ist Gegenstand vielfältiger Forschung und bisher am besten verstanden.

3.1.Determination und Differenzierung der Muskulatur im Embryo

Im Laufe der Entwicklung differenziert das Mesoderm (zusammengefasst in Übersichtsartikeln: de Joussineau et al., 2012; Dobi et al., 2015; Maqbool und Jagla, 2007). Dabei aktiviert der Transkriptionsfaktor Twist eine Vielzahl von Genen, die an der Spezifikation der verschiedenen mesodermalen Derivate beteiligt sind (Leptin, 1991; Sandmann et al., 2007; Thisse et al., 1987; Zeitlinger et al., 2007). So entstehen somatische Muskulatur, Herzmuskulatur, viszerale Muskulatur und der Fettkörper durch eine Kombination ektodermaler und mesodermaler Regulatoren (Azpiazu et al., 1996; Baylies und Bate, 1996; Frasch, 1995; Riechmann et al., 1997; Staehling-Hampton et al., 1994). In den promuskulären Clustern des somatischen Mesoderms bilden sich durch Notch/Delta vermittelte laterale Inhibition Progenitor-Zellen (Carmena et al., 1995). Diese teilen sich asymmetrisch in zwei sogenannte Gründerzellen („founder cell“, FC) oder eine FC und einen adulten Muskelvorläufer („adult muscle precursor“, AMP) (Carmena et al., 1998; Park et al., 1998; Ruiz Gomez und Bate, 1997). Die AMPs bleiben Twist-positiv, ruhen während der Embryonalentwicklung und werden zur Bildung der adulten Muskulatur während der Metamorphose benötigt (Bate et al., 1991). Die verbleibenden Zellen im promuskulären Cluster differenzieren zu fusionskompetenten Myoblasten („fusion competent myoblasts“, FCMs) (Carmena et al., 1995).

Die FCs bilden keine einheitliche Zellpopulation, sondern unterscheiden sich in der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Identität des zukünftigen Muskels festlegen (zusammengefasst in: Dobi et al., 2015; Tixier et al., 2010). Im Gegensatz dazu exprimieren alle FCMs den Transkriptionsfaktor *Lame duck* (Cunha et al., 2010; Duan et al., 2001; Furlong et al., 2001; Ruiz-Gomez et al., 2002). Alle Muskelzellen exprimieren den Transkriptionsfaktor *DMef-2* (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1994; Nguyen et al., 1994; Taylor et al., 1995).

3.2. Die Entstehung der larvalen somatischen Muskulatur im Embryo

3.2.1. Im Embryo können zwei Phasen der Myoblastenfusion unterschieden werden

Die somatische Muskulatur der *Drosophila* Larve besteht je abdominalem Hemisegment aus 30 mehrkernigen Muskeln, die sich in ihrer Größe, Position und Kernzahl unterscheiden und deren Anordnung sich von Hemisegment zu Hemisegment wiederholt (Bate, 1990, 1993). Ab Stadium 12 entstehen innerhalb von 5,5 Stunden die somatischen Muskeln durch heterotypische Fusion von jeweils einer FC mit mehreren FCMs in zwei zeitlich und funktionell unterscheidbaren Schritten (siehe Abb. 1; Beckett und Baylies, 2007; Rau et al., 2001; Rushton et al., 1995). Störungen beim Fusionsprozess lösen erkennbare Defekte bei der Anordnung der Muskulatur aus: es kommt häufig zu kleineren, falsch orientierten oder fehlenden Muskeln, zu unfusionierten Myoblasten nach Abschluss der Myogenese, sowie zu embryonaler Letalität (zusammengefasst in: Abmayr und Pavlath, 2012; Rochlin et al., 2010; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Im ersten Schritt fusioniert eine FC mit zwei bis drei FCMs und bildet so eine Muskelvorläuferzelle. Im zweiten Schritt fusionieren weitere FCMs mit der entstandenen Muskelvorläuferzelle, bis die benötigte Kernzahl erreicht ist (Übersichtsartikel: Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Nach erfolgreicher Zellfusion wird der Zellkern der FCM umprogrammiert und übernimmt das Transkriptionsprofil des wachsenden Muskels (Carrasco-Rando und Ruiz-Gómez, 2008; Dohrmann et al., 1990; Knirr und Frasch, 2001).

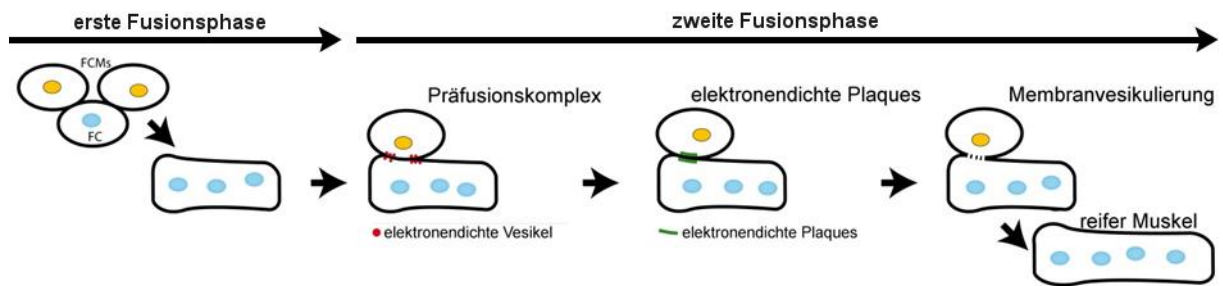


Abb. 1: Phasen der somatischen Myoblastenfusion im Embryo

Im ersten Fusionschritt entsteht die Muskelvorläuferzelle durch die Fusion einer FC (blau) mit bis zu drei FCMs (gelb). Im Anschluss fusionieren im zweiten Schritt weitere FCMs mit der Vorläuferzelle, wobei verschiedene Ultrastrukturen beobachtet werden können: Zuerst entstehen elektronendichte Vesikel, die den Präfusionskomplex bilden. Danach werden elektronendichte Plaques elektronenmikroskopisch sichtbar. Im Anschluss vesikulieren die Membranen und die FCM wird in den entstehenden Muskel integriert und die Zellkerne der FCM das Transkriptionsprofil des wachsenden Muskels annimmt (modifiziert nach Önel et al., 2011; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

In der zweiten Fusionsphase werden elektronenmikroskopisch Ultrastrukturen sichtbar (siehe Abb. 1): Vor der Fusion bilden sich elektronendichte Vesikel an den aneinandergrenzenden Membranen der fusionierenden Zellen und bilden den Präfusionskomplex (Doberstein et al., 1997; Estrada et al., 2007; Rau et al., 2001; Schröter et al., 2004). Es wird vermutet, dass diese Vesikel dem Golgi-Apparat entstammen (Kim et al., 2007). Das EF-Domänen Protein Swiprosin 1 (DSwip-1) ist möglicherweise zusammen mit dem MARVEL-Domänen Protein Singles Bar (Sing) an der Auflösung der elektronendichten Vesikel beteiligt (Estrada et al., 2007; Hornbruch-Freitag et al., 2011). Im Anschluss können elektronendichte Plaques an den aneinander liegenden Membranen beobachtet werden (Doberstein et al., 1997). Danach ist die Vesikulierung der Membranen in der unmittelbaren Nähe der Plaques, die daraus resultierende Entstehung einer zytoplasmatischen Kontinuität sowie die Integration der FCM in den wachsenden Muskel zu beobachten (Berger et al., 2008; Doberstein et al., 1997; Hamp et al., 2016; Kim et al., 2007; Schäfer et al., 2007). Der einzelne Fusionsprozess ist innerhalb weniger Minuten abgeschlossen (Beckett und Baylies, 2007; Richardson et al., 2007).

3.2.2. Die Zellfusion wird durch die Adhäsion der Myoblasten und die Entstehung eines Signalzentrums eingeleitet

Die Fusion wird durch die Erkennung und Anheftung der fusionierenden Zellen eingeleitet. Dies wird durch membranständige Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) gewährleistet: In FCs und wachsenden Myotuben wird Dumbfounded (Duf, auch als Kin of irre bezeichnet) und das in funktioneller Redundanz wirkende Roughest (Rst/ Irregular optic Chiasma) exprimiert (Ruiz-Gómez et al., 2000; Strunkelberg et al., 2001). Eine Deletion von

beiden, *duf* und *rst*, führt zu einem Ausbleiben der Myoblastenfusionen und resultiert in embryonaler Letalität (Ruiz-Gómez et al., 2000; Strükelberg et al., 2001). In FCMs sorgen Sticks and stones (Sns) und Hibris (Hbs) für die heterotypische Adhäsion (Bour et al., 2000; Dworak et al., 2001). Dabei ruft das Fehlen von Sns ein fast vollständiges Ausbleiben der Zellfusionen hervor, während der Verlust von Hbs nur leichte Defekte erzeugt (Bour et al., 2000; Shelton et al., 2009). Für die IgSFs konnten neben der embryonalen Myogenese weitere Funktionen im Verlauf der Entwicklung nachgewiesen werden, die unter anderem Zelladhäsion unabhängig von Zell-Fusion betreffen (zusammengefasst in: Fischbach et al., 2009).

Die aneinander adhärierenden IgSFs vermitteln nun das Fusionssignal ins Zellinnere. Eine bisher noch nicht vollständig aufgeklärte Signalkaskade wird ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes steht (Schäfer et al., 2007). Dies führt in der FCM zur Bildung eines Fokus aus filamentösem Aktin (F-Aktin), wohingegen in der wachsenden Myotube eine dünne Aktin-Schicht zu finden ist (Haralalka et al., 2011; Richardson et al., 2007; Rudolf et al., 2014; Sens et al., 2010). Mikrotubuli scheinen für den Fusionsprozess sowie die Ausbildung und Anheftung der Myotuben nicht essentiell (Rudolf et al., 2012), sind aber zusammen mit anderen Motor-Proteinen an der Positionierung der Zellkerne im Muskel beteiligt (Folker et al., 2012, 2014; Metzger et al., 2012; Schulman et al., 2014). Die Aktin-Struktur ist ringförmig umgeben von den IgSF-Molekülen und den Regulatoren der verzweigten F-Aktin Polymerisation (Kesper et al., 2007; Richardson et al., 2007). Diese direkt vor der Fusion auftretende Struktur wird als „Fusion-restricted Myogenic Adhesive Structure“ (FuRMAS; siehe Abb. 2) bezeichnet (Kesper et al., 2007). Außerdem wurden fingerartige Auswölbungen der FCM beschrieben, die bis in den wachsenden Muskel hineinreichen und als „Podosome-like Structure“ benannt (Doberstein et al., 1997; Hamp et al., 2016; Kim et al., 2015; Sens et al., 2010). Diese transienten Strukturen weisen Ähnlichkeiten zu immunologischen Synapsen, chemischen Synapsen, Podosomen und Invadopodien auf und können vergleichbare Funktionen als Signalzentrum übernehmen (Chen, 2011; Önel et al., 2011; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Önel et al., 2014). Im Anschluss an die Ausbildung der FuRMAS kann die Auflösung der Zellmembranen, der Abbau des F-Aktin Fokus und die anschließende Integration der FCM in den wachsenden Muskel beobachtet werden (Richardson et al., 2008). Ob die Auflösung der aneinandergrenzenden Membranen von einer entstehenden Fusionspore ausgeht (Sens et al., 2010), oder an mehreren Stellen simultan beginnt (Berger et al., 2008; Doberstein et al., 1997; Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007), konnte bisher nicht genau geklärt werden.

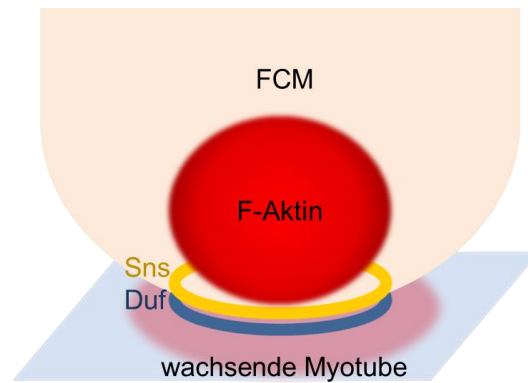


Abb. 2: Schematische Darstellung der FuRMAS

An der Kontaktstelle der fusionierenden Zellen lokalisieren die für die Erkennung und Anheftung der Myoblasten an die wachsende Myotube notwendigen Zelladhäsionsmoleküle Sns (gelb) und Duf (blau) ringförmig um einen Fokus aus F-Aktin (rot). In dieses Zentrum werden weitere Signalmoleküle rekrutiert, und es kommt an dieser Stelle zur Auflösung der Zellmembranen (in Anlehnung an Önel et al., 2014).

3.2.3. Die Zelladhäsion induziert eine komplexe Signaltransduktion, die zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts führt

Die Anheftung der Myoblasten aktiviert eine Vielzahl von Faktoren, die im Zusammenspiel die Zellfusion auslösen (Abb. 3). So ist das in FC/wachsenden Myotuben exprimierte Adapterprotein Rolling pebbles (Rols, auch als Antisocial bezeichnet) für eine vollständige embryonale Myoblastenfusion notwendig (Chen und Olson, 2001; Menon und Chia, 2001; Rau et al., 2001). Nach erfolgter Adhäsion wird Rols zur Membran rekrutiert und kolokalisiert mit Duf (Menon et al., 2005). An der Weiterleitung des Fusionssignals von den IgSFs zum Aktin-Zytoskelett könnte außerdem das Adapterprotein Dreadlock (Dock) beteiligt sein. Dock kann mit Duf, Rst, Sns und Hbs interagieren und kolokalisiert mit ihnen (Kaipa et al., 2012).

Rols besitzt das Potential, mit dem Guanidin Austauschfaktor (Guanidin Exchange Factor = GEF) Myoblast city (Mbc) zu interagieren und könnte auf diese Weise das Zytoskelett beeinflussen (Chen und Olson, 2001). Deshalb wird vermutet, dass Rols eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung auf Seiten des wachsenden Muskels einnimmt. Des Weiteren bindet Rols an das nichtklassische Myosin „Myosin heavy chain like“ (Mhcl) und kann dessen Lokalisation beeinflussen (Bonn et al., 2013). Mbc besitzt die Fähigkeit, die redundanten GTPasen Rac1 und Rac2 zu aktivieren (Geisbrecht et al., 2008; Nolan et al., 1998). Deletionen von *mbc* oder *rac* führen zu einer beeinträchtigten Myoblastenfusion (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Luo et al., 1994). Rac wiederum beeinflusst den Aktin-regulierenden Faktor „Suppressor of cyclic AMP receptor“ (SCAR), der den Arp2/3-Komplex aktivieren kann (Gildor et al., 2009; Takenawa und Suetsugu, 2007; Zallen et al., 2002). Die Stabilität von

SCAR wird dabei von Kette, dem Homolog von Nap1, beeinflusst (Hamp et al., 2016; Richardson et al., 2007; Schröter et al., 2004). In den FCMs kann Arp2/3 zusätzlich durch den Komplex von „Wiskott-Aldrich Syndrom Protein“ (WASp) und D-Wip (auch Solitary oder Verprolin 1 genannt) aktiviert werden (Berger et al., 2008; Massarwa et al., 2007; Schäfer et al., 2007). Dies wird durch die kompetitive Bindung von Blown fuse (Blow) an D-Wip reguliert (Doberstein et al., 1997; Jin et al., 2011), wovon wiederum gezeigt werden konnte, dass es genetisch mit Kette interagiert (Schröter et al., 2004). Im Gegensatz zu Rols kann das Adapterprotein Dock die Aktin-regulierenden Proteine D-Wip, WASp und SCAR direkt binden (Kaipa et al., 2012). Auch Crk könnte eine solche Rolle einnehmen: *in vitro* Daten zeigen, dass Crk eine Verbindung zwischen D-Wip und Sns herstellen könnte (Galletta et al., 1999; Kim et al., 2007).

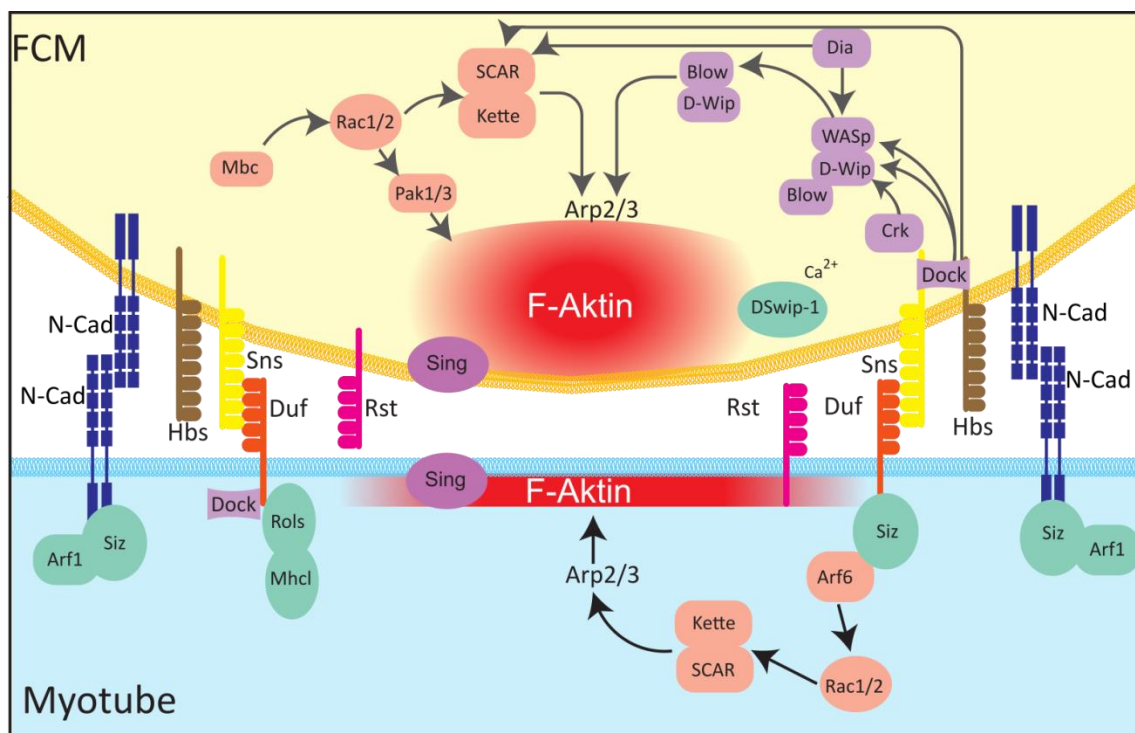


Abb. 3: Die Zelladhäsionsmoleküle aktivieren Signalketten, die zur Myoblastenfusion führen

Nach erfolgreicher Zelladhäsion wird in der zweiten Fusionsphase die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes eingeleitet. Arp2/3 wird über SCAR aktiviert, das von Kette beeinflusst und durch Rac aktiviert wird. In FCMs kann Arp2/3 auch über den D-Wip/WASp-Komplex, der von Blow reguliert wird, aktiviert werden. An der Aktivierung der Aktin-regulierenden Proteine sind die Adapterproteine Rols, Mbc, Dock und Schizo beteiligt (modifiziert nach Önel et al., 2014).

Eine weitere Komponente der embryonalen Myogenese ist Schizo (Siz, auch als Loner bezeichnet). Siz wird in Abhängigkeit von Duf zur Zellmembran rekrutiert, könnte dort als GEF für die GTPase Arf6 agieren und so auf Rac wirken (Chen et al., 2003). Allerdings wurden aufgrund der Aktin-Fokus Form in *siz*-mutanten Embryonen alternative Funktionen

von Siz in der Myogenese vermutet (Richardson et al., 2007). Bis zur Fusion exprimieren die fusionierenden Zellen das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin (N-Cad) auf der gesamten Zelloberfläche. N-Cad wird vermutlich vor der Fusion durch Siz in Abhängigkeit von Arf1 endozytiert, um eine enge räumliche Annäherung der beiden Zellmembranen zu ermöglichen (Dottermusch-Heidel et al., 2012; Önel et al., 2014).

Die Lokalisation von SCAR und WASp an der Fusionsstelle und die Bildung des Aktin-Fokus scheint außerdem vom Formin Diaphanous (Dia) abzuhängen (Deng et al., 2015). Die durch Rac aktivierbaren redundanten p21-aktivierenden Kinasen Pak1 und Pak3 unterstützen den Fusionsprozess zusätzlich, wobei der genaue Einfluss auf das Zytoskelett nicht vollständig aufgeklärt ist, da sie nicht direkt an der Aktin-Polymerisation beteiligt sind (Duan et al., 2012).

3.3. Phosphagene können als Energie-Puffer agieren und sind evolutionär konserviert

Die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts ist angewiesen auf die Bereitstellung von ATP, da sowohl die Reorganisation selbst ein energieaufwändiger Vorgang ist, als auch für die Exozytose von Vesikeln und auch die Membranfusion selbst ATP benötigt (Carlsson, 2010; Martens und McMahon, 2008). Energie in Form von ATP kann jedoch nur schwer gespeichert und transportiert werden. In den Myoblasten der Vertebraten wird der Creatinkinase-vermittelte Erhalt der Energie-Homöostase für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts genutzt (Mahajan et al., 2000). So unterstützt Creatinkinase (CK) die F-Aktin Polymerisation während der Phagozytose der Makrophagen (Kuiper et al., 2008). In primären Maus-Myoblasten konnte außerdem gezeigt werden, dass CK die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und damit den Zuwachs von Zellkernen unterstützt (O'Connor et al., 2008).

CK gehört zur Enzym-Familie der Phosphagene (auch Guanido-Kinasen genannt) zu der auch die Argininkinase (Argk) in *Drosophila* gehört. Phosphagene sind an vielen Funktionen innerhalb der Zelle z.B. der Regulation der inorganischen Phosphatkonzentration, Protonen-Puffer, intrazellulärem Energietransport und dem Erhalt der Energie-Homöostase in Zeiten großer Energie-Fluktuation beteiligt (Übersichtsartikel: Wallimann et al., 1992). So kann CK durch die Phosphorylierung von Creatin mit Hilfe von ATP an Orten der Energieproduktion und der Generierung von ATP aus ADP durch Dephosphorylierung von Phospho-Creatin als Energie-Puffer agieren (siehe Abb. 4). Diese Enzymreaktion ist energetisch nahe am Gleichgewicht und daher umkehrbar (Dzeja und Terzic, 2003; Ennor und Morrison, 1958).

Unter den Phosphagenen sind die Creatinkinasen bisher am besten untersucht (Ellington, 2001; Muhlebach et al., 1994; Saks et al., 2007; Schlattner et al., 2006).

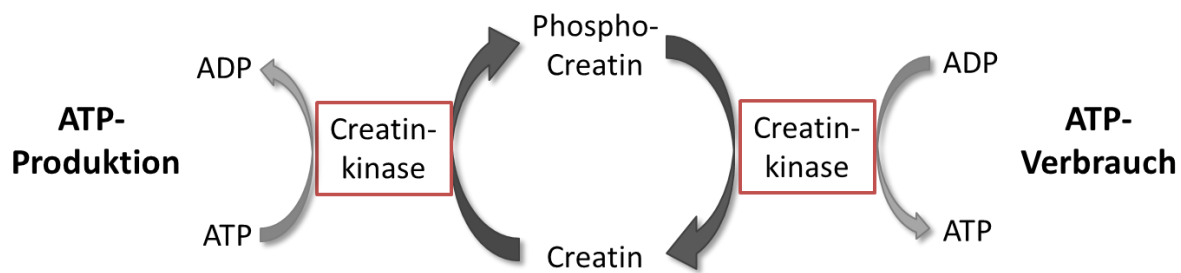


Abb. 4: Energiespeicherung durch Phosphogene am Beispiel der Creatinkinase

An Orten der Energieproduktion wird Phospho-Creatin unter ATP-Aufwand hergestellt, wobei an Orten des Energiebedarfs ATP durch Verbrauch von Phospho-Creatin generiert wird.

Alle Phosphogene verfügen über die charakteristische Guanido-Gruppe, sind phylogenetisch weit verbreitet und besitzen ein hohes Maß an Sequenzähnlichkeit zwischen verschiedenen Spezies (Andrews et al., 2008; Cantwell et al., 2001; Conejo et al., 2008; Fraga et al., 2015; Uda et al., 2006). Die Mitglieder der Phosphagen-Familie werden anhand ihres Substrats unterschieden (Ellington, 2001). Das Phosphagen in *Drosophila* nutzt Arginin als Substrat und wird daher als Argk bezeichnet. Die Funktionen der Argk in *Drosophila* wurden bisher kaum untersucht. So ist noch offen, ob ein Zusammenhang zur Myogenese besteht, ähnlich wie es bei Vertebraten scheint. In Transkriptom-Analysen zeigte sich jedoch, dass *argk* in FCs und FCMs transkribiert (Estrada et al., 2006) und, wie auch Blow, von Notch und Ras reguliert wird (Artero et al., 2003).

Für *Drosophila argk* werden in Datenbanken verschiedene Proteinvarianten vorhergesagt, die sich im N-Terminus unterscheiden, aber den gleichen C-Terminus besitzen. Die für die enzymatische Aktivität relevanten und evolutionär konservierten Teile des Proteins sind innerhalb dieses nicht-variablen Bereichs zu finden (Attrill et al., 2016). So befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins der „active site loop“, in dem durch die Bindung des Substrats eine Konformations-Änderung ausgelöst wird (Azzi et al., 2004; Cantwell et al., 2001). In der Literatur werden außerdem weitere Bereiche im Protein als funktionell relevant diskutiert. So befindet sich im Protein ein potentiell Adenin-Nukleotid Bindemotiv und die sogenannte NEED-Box, die im Wesentlichen aus einem hoch konservierten Motiv aus Asparagin, Glutaminsäure, Glutaminsäure und Asparaginsäure besteht (Muhlebach et al., 1994; Strong und Ellington, 1995). Ein Basenaustausch in der NEED-Box führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Cantwell et al., 2001).

3.4. Während der Metamorphose kommt es zur Umstrukturierung der Muskulatur

Die im Embryo entstandenen Muskeln werden im Verlauf der Metamorphose umgestaltet. Nach Verpuppung histolysiert ein Großteil der Muskulatur und neue Muskeln entstehen. So bildet sich die dorsoventrale Thoraxmuskulatur (DVM) als ein Teil indirekter Flugmuskeln (IFM), die direkte Flugmuskulatur (DFM) und die Beinmuskulatur *de novo* aus Myoblasten, die den Flügel- bzw. Beinimaginalscheiben als ad epitheliale Zellen anhaften (siehe Abb. 5; Fernandes et al., 1991; Ghazi et al., 2000; Maqbool et al., 2006; Soler et al., 2004). Die abdominale Muskulatur entsteht aus Myoblasten, die assoziiert mit den Motoneuronen vorliegen (Currie und Bate, 1991). Im Gegensatz zur Neuentstehung der Muskulatur nutzt die dorsale longitudinale Muskulatur (DLM) im Thorax persistierende larvale Muskeln als „Gerüst“, mit dem die Myoblasten der Flügelimaginalscheibe nach der Einwanderung in den Thorax fusionieren (Fernandes et al., 1991).

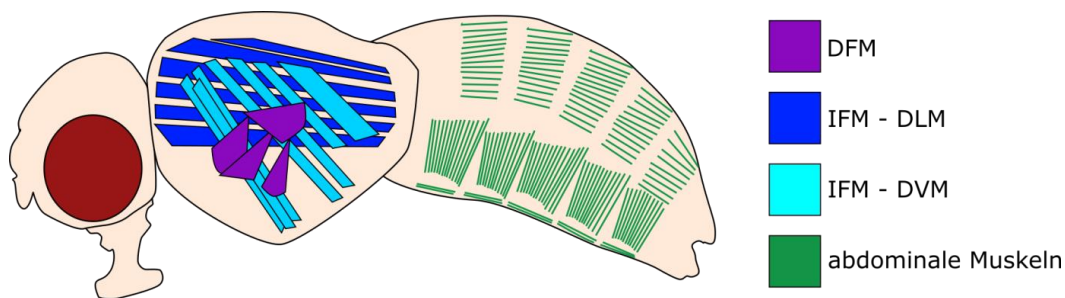


Abb. 5: Schematische Darstellung der adulten Muskulatur in Thorax und Abdomen

Die abdominale Muskulatur (grün) entsteht wie die dorsoventrale indirekte Flugmuskulatur (cyan) und die direkte Flugmuskulatur (lila) *de novo* aus AMPs. Die dorsale longitudinale indirekte Flugmuskulatur (dunkelblau) entsteht durch Fusion von Myoblasten mit persistierenden larvalen Muskeln (modifiziert nach Dobi et al., 2015).

Die bereits im Embryo angelegten AMPs proliferieren während der Larvenstadien ohne zu differenzieren (Bate et al., 1991; Roy und VijayRaghavan, 1999). Aus diesem Grund wird für AMPs ein Stammzell-ähnlicher Charakter diskutiert (Übersichtsartikel: Figeac et al., 2007). Wie auch im Embryo fusionieren während der pupalen Myogenese heterotypische Zellen miteinander. So konnte gezeigt werden, dass sowohl der Teil der AMPs, der Flug- und abdominale Muskeln bildet als auch die larvalen Gerüstmuskeln zur Bildung der DLM Duf exprimieren (Dutta et al., 2004; Kozopas und Nusse, 2002). Bei der Entstehung der DLM wurden außerdem Sns, Hbs und Rst nachgewiesen, wobei die Expression von Sns hier vom Notch-Signalweg abzuhängen scheint (Gildor et al., 2012). Die Myoblasten werden hier durch Filipodien, die aus den Gerüstmuskeln hervortreten, zum wachsenden Muskel geführt (Segal et al., 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl einige Aktin-Regulatoren der

embryonalen Myogenese als auch Sing ebenfalls essentiell für die Entstehung der adulten Muskeln sind (Dhanyasi et al., 2015; Mukherjee et al., 2011). Ähnliche Mechanismen wie bei der Entstehung der larvalen Muskulatur lassen sich deshalb auch während der Metamorphose vermuten.

3.5. Die Entwicklung des männlichen Reproduktionstrakts

Das Reproduktionssystem der *Drosophila* Männchen besteht aus den inneren und äußeren Genitalien, wobei die inneren Organe die Produktion der Spermien und Sekrete sowie deren Freisetzung gewährleisten und die äußeren Geschlechtsorgane die Kopulation ermöglichen (Abb. 6 A; Bodenstein, 1950; Bryant, 1978). Die Spermatogenese läuft in den paarig angelegten Testes ab. Dabei entstehen aus einer diploiden Stammzelle, die sich in der apikal gelegenen Hubregion befindet, 64 haploide Spermien (Fuller, 1993). Diese werden am proximalen Ende des Testis als individualisierte Spermien in die Samenblase entlassen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993; White-Cooper, 2010). Die Samenblasen und die ebenfalls paarigen Anhangsdrüsen, die sogenannten Paragonien, produzieren für die Kopulation und die Haltbarkeit der Spermien benötigte Sekrete (zusammengefasst in: Wolfner, 2007) und enden im Ductus ejaculatus, der über die Spermienpumpe zu den äußeren Genitalien, dem Penisapparat, führt (Abb. 6 A). Die inneren Organe sind umgeben von dünnen Muskelschichten. Zusätzlich befindet sich eine Schicht aus Pigmentzellen um Testes und Samenblasen (Fuller, 1993).

Der männliche Reproduktionstrakt entwickelt sich aus den Gonaden und der unpaarigen, sexuell dimorphen Genitalimaginalscheibe (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Genitalscheibe bezeichnet), die ektodermalen Ursprungs ist. Im Verlauf der Metamorphose wachsen Genitalscheibe und Gonaden aufeinander zu und verbinden sich schließlich. Dabei gehen aus der Genitalscheibe alle somatischen Teile des Reproduktionstrakts, die äußeren Genitalien und Teile des Hinterdarms hervor (Bodenstein, 1950; Bryant, 1978; Estrada et al., 2003). Die Testes und die Pigmentzellen entstehen aus den Gonaden, in denen sich auch die Keimzellen befinden (Abb. 6 B; Bodenstein, 1950; Stern und Hadorn, 1939).

Die Bildung des männlichen Reproduktionstrakts wird durch homöotische Gene und die Geschlechtsdeterminations-Hierarchie beeinflusst (Chen und Baker, 1997; Christiansen et al., 2002). Dabei scheinen die Pigmentzellen eine zentrale Rolle zu spielen. Die Pigmentzellen entstehen nur in Männchen und ihre Entwicklung scheint abhängig von der Expression des Transkriptionsfaktors Sox100B zu sein (DeFalco et al., 2008; Nanda et al., 2009).

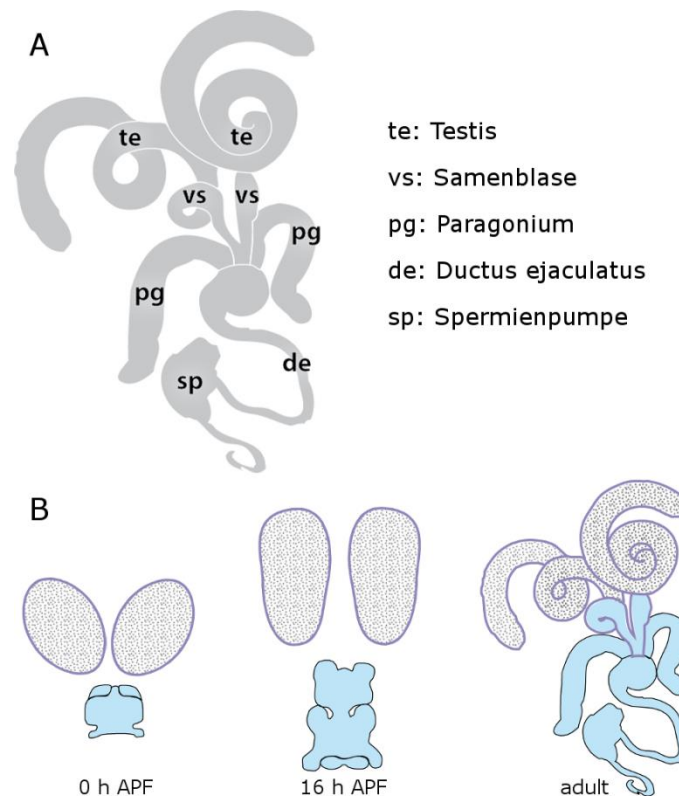


Abb. 6: Schematische Darstellung der inneren Organe des männlichen Reproduktionssystems

Der männliche Reproduktionstrakt besteht aus paarigen Testes, Samenblasen und Paragonien sowie einem Ductus ejaculatus und einer Spermienspume (A). Nach der Verpuppung („after puparium formation“, APF) liegen Genitalscheibe (blau) und Testes (grau) unabhängig voneinander vor, wobei die Pigmentzellen (lila) auf den Testes zu finden sind. Im Verlauf der Entwicklung wachsen die Testes und die Genitalscheibe aufeinander zu, verschmelzen und bilden den adulten inneren Reproduktionstrakt (B) (modifiziert nach Bodenstein, 1950).

Über die Eigenschaften der Muskulatur des männlichen Reproduktionssystems und deren Entstehung ist nur wenig bekannt. Analysen im weiblichen Reproduktionstrakt konnten drei verschiedene Muskeltypen mit verschiedenen Charakteristika identifizieren: Die Muskeln des Ovidukts sind mehrkernig und ähneln der somatischen Muskulatur. Die Muskeln der Epithelialschicht, die die Ovariolen umgeben, und Muskeln der Peritonealschicht, die die Ovarien umgeben, umspannen die Organe netzartig und sind vergleichbar mit der viszeralen Muskulatur, wobei die Muskeln der Epithelialschicht einkernig sind (Hudson et al., 2008). Im männlichen Reproduktionstrakt entstammen alle Muskeln, auch die der Testes, den adepithe-lialen Myoblasten der Genitalscheibe. Die Testis-relevanten Myoblasten wandern im Verlauf der Entwicklung in entgegengesetzter Richtung zu den Pigmentzellen auf die Testes (Kozopas et al., 1998). Dieser Prozess ist in Fliegen mit Mutation im Locus von *DWnt-2* gestört (Kozopas et al., 1998). Durch Transplantations- und Kultivierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Kontaktaufnahme von Samenblase und Testis für die Migration der Muskeln und Pigmentzellen und die korrekte Formgebung des adulten Testis essentiell ist (Bodenstein, 1950; Gärtner et al., 2014; Stern, 1941a, b).

3.6. Ziele der Arbeit

Für die embryonale Myogenese muss viel intrazelluläre Energie bereitgestellt werden, da die Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts ein sehr energieaufwändiger Vorgang ist (Carlsson, 2010). Auch für die Exozytose von Vesikeln und die Membranfusion selbst wird ATP benötigt (Martens und McMahon, 2008). Wie die Energie während der Myoblastenfusion bei der Entstehung der larvalen somatischen Muskulatur in *Drosophila* bereitgestellt wird, ist jedoch unbekannt. Ähnlich wie durch CK bei Vertebraten (O'Connor et al., 2008) könnte ein hoher zellulärer Energiebedarf in *Drosophila* durch Argk kurzzeitig überbrückt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll aus diesem Grund eine mögliche Beteiligung von Argk an der Myoblastenfusion zur Bildung der larvalen somatischen Muskulatur in *Drosophila* analysiert werden. Dafür soll mittels immunhistochemischen Methoden die subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Die Analysen von homozygot mutanten oder defizienten Embryonen soll weiterhin Aufschluss darüber geben, ob Argk Einfluss auf die Myoblastenfusion hat.

Die embryonale Myogenese von *Drosophila* wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Andere Muskelentstehungsprozesse, beispielsweise während der Metamorphose, standen allerdings weniger im Fokus. Dabei weist die Entstehung der adulten Muskeln große Ähnlichkeit zu den Vorgängen in Vertebraten auf (Figeac et al., 2007). Im Gegensatz zu anderen Bereichen sollten Störungen im Reproduktionstrakt die Vitalität der Tiere und die Fähigkeit zu Schlüfen nicht beeinträchtigt, sondern lediglich Fertilitätsstörungen verursachen. Analysen im weiblichen Reproduktionssystem beschreiben verschieden gestaltete Muskulatur mit unterschiedlichen Eigenschaften (Hudson et al., 2008; Middleton et al., 2006). Die Muskulatur des adulten männlichen Reproduktionstrakts ist kaum untersucht. Erste Analysen zeigten Muskelschichten mit verschiedenen Charakteristika um die inneren Organe des männlichen Reproduktionssystems (Hornbruch, 2010). Ziel dieser Arbeit ist, die Entstehung der mehrkernigen Testismuskulatur zu untersuchen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur embryonalen Myogenese aufzuzeigen. Nach der Charakterisierung der verschiedenen Muskeltypen mittels verschiedener GFP-Proteintrap Linien soll im zweiten Schritt untersucht werden, ob die mehrkernige Testismuskulatur ebenfalls durch Myoblastenfusion entsteht und wann genau dieser Prozess während der Metamorphose stattfindet. Im weiteren Verlauf kann dann der Einfluss der IgSF-Moleküle Duf und Rst auf die Entstehung der Testismuskulatur analysiert werden. Da die Muskelschichten des Reproduktionstraktes kein etabliertes Modell zur Untersuchung der Myoblastenfusion darstellten, sollen außerdem die Methoden etabliert werden, mit deren Hilfe die Beantwortung der Fragestellungen möglich waren.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Materialien

4.1.1. Geräte

Gelelektrophorese-Apparatur	Werkstätten MPI Martinsried und Uni Marburg
Heizblock Rotilabo Block Heater H250	Roth, Karlsruhe
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Magnet-Kochrührer Variomag Mono	H+P Labortechnik, München
NanoDrop 2000 Spektrometer	Thermo Fischer Scientific, USA
PCR Maschine Personal Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Schüttler Rocky [®] 3D	Föbel Labortechnik, Lindau
Schüttler GFL 3005	Biometra, Göttingen
Spannungsquellen Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator TI1	Biometra, Göttingen
Vortex-Gerät Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad GFL 1002	Biometra, Göttingen

Mikroskope (alle Zeiss, Jena)

Binokular „Stemi SV6“
 Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2“ mit ApoTome
 Fotomikroskop „Axioskop“
 Inverses Mikroskop „Axiophot Observer Z1“ mit ApoTome
 Spinning Disc „AxioObserver.Z1“, Laserrack 405, 488, 561, 635 nm

4.1.2. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem (Darmstadt), Merck Millipore (und zugehörige Firmen wie z.B. Sigma-Aldrich oder Fluka, Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Thermo Fischer Scientific (und zugehörige Firmen wie z.B. Life Technologies, USA)

4.1.3. Verwendungsfertige Lösungen, Enzyme und Kits

Accu Prime High Fidelity Polymerase	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA
Cell Dissociation Buffer	C-1544, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
Click-iT [®] EdU Alexa Fluor [®] 594	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific, USA
Fötales Kälberserum (FBS)	S0113, Merck Millipore, Darmstadt
DIG-RNA-Labeling-Mix	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Darmstadt
DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Dynabeads [®] Mouse CD8 (Lyt2)	11447D, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA
Fluoromount G [™]	Southern Biotech, UK
Gateway [®] LR Clonase [®] II Enzyme Mix	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA
illustra [™] GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare Life Science, Freiburg
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren
pENTR [™] /D-TOPO [®] Cloning Kit	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main oder Fermentas, Thermo Fischer Scientific, USA
Rinder-Insulin	I-6634, Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
RNase A	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Darmstadt
RNAqueous Micro Kit	Ambion, Thermo Fischer Scientific, USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Polymerasen SP6, T3, T7	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Darmstadt
Schneider's Medium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, USA
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA
TSA Fluorescein System	PerkinElmer, USA
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Löffelbach

4.1.4. Lösungen, Puffer und Medien

Puffer A

Tris/HCl (pH 7,5)	0,1 M
EDTA (pH 8,0)	0,1 mM
NaCl	0,1 M
SDS	10 % (w/v)

Auftragspuffer für Gelelektrophorese

Xylencylanol	0,1 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Glycerin	80 %
10x TBE	10 %

Kulturmedium für *ex vivo* Kultur von pupalen Genitalscheiben

Fötale Kälberserum (FBS)	10 % (w/v)
Rinder-Insulin	0,5 % (w/v)
in Schneider's Medium	

DIG1 (pH 7,5)

Tris/HCl	100 mM
NaCl	150 mM

DIG3

NaCl	100 mM
Tris/HCl (pH 9,5)	100 mM
MgCl ₂	50 mM

E1

Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml

E2

NaOH	200 mM
SDS	1 %

E3 (pH 5,5)

Kaliumacetat	3,1 M
pH-Wert mit Essigsäure einstellen	

E4 (pH 5,0)

NaCl	600 mM
Natriumacetat	100 mM
TritonX-100	0,15 %
pH-Wert mit Essigsäure einstellen	

E5 (pH 5,0)

NaCl	800 mM
Natriumacetat	100 mM
pH-Wert mit Essigsäure einstellen	

E6 (pH 5,0)

NaCl	1,5 M
Natriumacetat	100 mM
pH-Wert mit Essigsäure einstellen	

Epon

Epon 812	51,5 % (v/v)
Epon Härter DDSA	28 % (v/v)
Epon Härter MNA	19 % (v/v)
Epon Beschleuniger DMP 30	1,5 % (v/v)

Färbepuffer für *in situ* Hybridisierung

NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM
Tris (pH 9,5)	100 mM
Levamisol	1 mM
Tween 20	0,1 % (w/v)

X-Phosphat = BCIP (5-Brom- 4-chlor- 3-indolylphosphat)

Stammlösung: 50 mg/ml in DMF

NBT (Nitro blue tetrazoliumchloride)

Stammlösung: 1 mg/ml

Fruchtsaftagar

Apfel- oder Traubensaft	25 % (w/v)
Saccharose	1,25 % (w/v)
Nipargin	0,2 % (w/v)
Select Agar	2,7 %

Hybridisierungslösung (HS)

Formamid	50 % (w/v)
SSC	5 x
Heparin	100 µg/ml
Lachssperma DNA	100 µg/ml
Tween 20	0,1 % (w/v)

Luria Bertani (LB)-Medium (pH 7,0)

Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
für LB-Platten wird 2 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt	
Endkonzentration der eingesetzten Antibiotika:	
Ampicillin:	100 µg/ml
Kanamycin:	50 µg/ml
Chloramphenicol:	20 µg/ml

Maisgries-Agar

Maisgries	60 %
Fruktose	7,15 %
Trockenhefe	1,2 %
Nipargin	0,14 %
Propionsäure	0,6 %
Agar	0,7 %

PBS (phosphate buffered saline)

NaCl	130 mM
Na ₂ HPO ₄	7 mM
NaH ₂ PO ₄	3 mM

PBT

Tween 20	0,1 % (w/v)
in PBS	

20x SSC (pH 7,0)

Na ₃ Citrat	300 mM
NaCl	3 M

10x TBE

Tris/HCl (pH 8,2)	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	0,2 M

TNX

NaCl	0,7 % (w/v)
Triton X-100	0,01 % (w/v)

4.1.5. cDNAs und VektorencDNAs

<i>argk</i> :	GH11670
<i>CG5144</i> :	RH66859
<i>CG4546</i> :	GH24918

Die verwendeten cDNAs wurden von DGRC (*Drosophila* Genomics Resource Center, USA) bezogen.

Vektoren

pCR TM II-TOPO [®]	TOPO-Vektor, Teil des TOPO [®] TA Cloning Kits
pENTR TM /D-TOPO [®]	TOPO-Vektor zur Weiter-Klonierung in „Gateway“-Vektor, Teil des pENTR TM /D-TOPO [®] Cloning Kits
pUAST-attB-rfa-GFP	„Gateway“-Vektor, zur Verfügung gestellt von S. Bogdan, Universität Münster
pUASP-attB-rfa-10xMyc	„Gateway“-Vektor, zur Verfügung gestellt von S. Bogdan, Universität Münster

4.1.6. Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) hergestellt.

<u>Primernamen</u>	<u>Sequenz des Primers</u>	<u>T_m</u>
<u>Klonierung von <i>argk</i></u>		
ArgkFL-pENTRfwd	5'-CACC-ATGTTTCGCTTTGTGGTATTTAAC-3'	57 °C
ArgkFL-rev	5'-CAGGCTCTTCTCGAGCTTGA-3'	56 °C
ArgkdCterm-rev	5'-GGCATCGTTGTGGTAGATGCC-3'	55 °C
<u>Klonierung von CG30274</u>		
CG30274int1fwd	5'-TTCCCGACGATCTGCACAGTGC-3'	59 °C
CG30274rev	5'-CATCGTGGATCGCAACTAG-3'	52 °C
<u>Überprüfung der Lokalisation der P-Elemente in ZCL0789 und YB0338</u>		
ArgkE5-1fwd	5'-CGTTGGACGTTGAATTCTACGG-3'	55 °C
ArgkI5-1rev	5'-GCCGGCATTATATCAACCCGAAC-3'	56 °C

Überprüfung der Lokalisation des P-Elements in L311

trolfwd1	5'-CTATGCACAGCGTAGAGTGTTCAG-3'	58 °C
trolrev1	5'-GCCTGAATGACAGACCATCGAAC-3'	56 °C

P-Element Primer

Pry1	5'-CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT-3'	60 °C
Pry2	5'-CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT-3'	60 °C
Plac1	5'-CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT-3'	60 °C
Pwht1	5'-GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA-3'	60 °C
PLF	5'-CTTGACCTTGCCACAGAGGACTATTAGAGG-3'	65 °C
PLR	5'-CAGTGACACTTACCGCATTGACAAGCACGC-3'	65 °C
PRF	5'-CCTCGATATACAGACCGATAAAACACATGC-3'	55 °C
PRR	5'-AGTCAGTCAGAAACAACCTTGGCACATATC-3'	55 °C

RT-PCR Primer

dufRT1fwd	5'-GCACGAGATTCAACAGTCGCAG-3'	64 °C
dufRT1rev	5'-GCTGCTGGCGGTCAAGTTGG-3'	65 °C
rstRT1fwd	5'-TGCCACCGAGGATCGCAAAG-3'	63 °C
rstRT1rev	5'-GCAGCGGTATCACCGTGTAC-3'	63 °C
snsRT1fwd	5'-CTGCACATCAAGGACGCGAAG-3'	63 °C
snsRT1rev	5'-CTCGTAGGTCAGCGAATCAATC-3'	62 °C
hbsRT1fwd	5'-GTGTGGAGCGCAGTGATATTGG-3'	64 °C
hbsRT1rev	5'-CTTGAGATCCTTGCCATGACGAC-3'	65 °C
alphantub84B1fwd	5'-CATAGCCGGCAGTTCGAACG-3'	63 °C
alphantub84B1rev	5'-GGACCTCATCGACCACAGTG-3'	63 °C
twistRT1fwd	5'-GAGGAGACGGACGAGTTCAG-3'	63 °C
twistRT1rev	5'-GCCTTGCGCAGGCACTTCAG-3'	65 °C

4.1.7. Sequenzierung

Für Sequenzierungen von DNA-Proben wurde der Ready2 Run Einzelproben-Service von LGC Genomics GmbH (Berlin) genutzt.

4.1.8. Generierte KonstruktepUAST-Argk-GFP

aus cDNA amplifiziert mit ArgkFL-pENTRfwd und ArgkFL-rev, kloniert über Zwischenvektor pENTR™/D-TOPO® in den finalen „Gateway-Vektor“ pUAST-attB-rfa-GFP

pUASP-Argk-Myc

aus cDNA amplifiziert mit ArgkFL-pENTRfwd und ArgkFL-rev, kloniert über Zwischenvektor pENTR™/D-TOPO® in den finalen „Gateway-Vektor“ pUASP-attB-rfa-10xMyc, genutzt

zur Generierung transgener Fliegen durch Φ C31-vermittelte, gerichtete Integration auf dem 3. Chromosom

pUAST-Argk Δ C-GFP

aus cDNA amplifiziert mit ArgkFL-pENTRfwd und ArgkdCterm-rev, kloniert über Zwischenvektor pENTRTM/D-TOPO[®] in den finalen „Gateway-Vektor“ pUAST-attB-rfa-GFP

pUASP-Argk Δ C-Myc

aus cDNA amplifiziert mit ArgkFL-pENTRfwd und ArgkdCterm-rev, kloniert über Zwischenvektor pENTRTM/D-TOPO[®] in den finalen „Gateway-Vektor“ pUASP-attB-rfa-10xMyc, genutzt zur Generierung transgener Fliegen durch Φ C31-vermittelte, gerichtete Integration auf dem 3. Chromosom

CG30274 in pCRTMII-TOPO[®]

aus genomischer DNA amplifiziert mit CG30274int1fwd und CG30724rev, genutzt für *in situ*-Hybridisierungen

4.1.9. Antikörper, Seren und Farbstoffe

Primäre Antikörper

Anti- β -Galaktosidase	Kaninchen, 1:5000	Biotrend, Köln
Anti- β 3-Tubulin	Meerschweinchen, 1:10000	Leiss et al., 1988
Anti-DIG	AP-gekoppelt, im Spot-Test: 1:5000, <i>in situ</i> : 1:2000	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-DIG	biotinyliert, 1:2000	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-GFP	Kaninchen, 1:2000	ab3223; Abcam, UK
Anti-Tropomyosin	Ratte, 1:1000	ab50567; Abcam, UK
Anti-DMef2	Kaninchen, im Embryo: 1:200, im Reproduktionstrakt: 1:1000	zur Verfügung gestellt von H. Nguyen, Universität Erlangen
Anti-Phospho-H3 (Ser10)	Kaninchen, 1:500	06-570; Merck Millipore, Darmstadt
Anti-Myc	Kaninchen, 1:2000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Myc	Maus, 1:2000	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-CoxIV	Maus, 1:100	mAbcam33985; Abcam, UK
Anti-CK	Maus, 1:5 – 1:500 getestet	CK-JAC (6F11), Developmental Studies, Hybridoma Bank, USA

Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen DyLight 488	im Embryo: 1:500 im Reproduktionstrakt: 1:2000	Vector Laboratories, Lörrach
Anti-Kaninchen DyLight 549	im Embryo: 1:250	Vector Laboratories, Lörrach
Anti-Maus cy5	im Embryo: 1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Anti-Maus DyLight 488	im Embryo: 1:250	Vector Laboratories, Lörrach
Anti-Ratte Alexa Fluor 488	im Reproduktionstrakt: 1:2000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Anti-Meerschweinchen cy2	im Embryo: 1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Anti-Meerschweinchen cy3	im Embryo: 1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Anti-Meerschweinchen cy5	im Embryo: 1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Anti-Meerschweinchen biotinyliert	im Embryo: 1:400	Vector Laboratories, Lörrach

Seren

Ziegenserum	Vector Laboratories, Lörrach
Pferdeserum	Vector Laboratories, Lörrach

Farbstoffe

Atto-565-Phalloidin	Endkonzentration: 4 nmol/l	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Endkonzentration: 3 µg/ml	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt

4.1.10. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5α	chemisch kompetente Zellen, SupE44, <i>AlacU169</i> (<i>Φ80lacZAM15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-l</i> , <i>rel A1</i>
<i>E. coli</i> TOP10	chemisch kompetente Zellen, <i>F</i> ⁺ (<i>lac</i> ^q <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^R)), <i>mcrA Δ</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>Φ80lacZAM15</i> , <i>AlacX_74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , <i>Δ</i> (<i>ara-leu</i>) 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> , (<i>Str</i> ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Teil des TOPO [®] TA Cloning Kit oder des pENTR [™] /D-TOPO [®] Cloning Kit, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, USA)

4.1.11. *Drosophila melanogaster* Fliegenlinien

Die mit „BL“ gekennzeichneten Linien wurden vom „Bloomington *Drosophila* Stock Center“ und die mit „v“ benannten Linien vom „Vienna *Drosophila* RNAi Center“ erworben. Proteintrap-Linien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Flytrap bezogen.

Mutanten und Defizienzen

w ¹¹¹⁸	BL5905; Wildtypkontrolle
ΦC31 Integrationsstamm	BL24749; zur gerichteten Integration auf dem 3. Chromosom
Df(3L)BSC170	BL9561; defizient für <i>argk</i>
Df(3L)BSC130	BL9295; defizient für <i>argk</i> und <i>CG5144</i>
Df(1)w ^{67k30}	BL 6018; defizient für <i>duf</i> und <i>rst</i>
sns ²⁰⁻²³	Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000
blow ²	Doberstein et al., 1997
wip ^{30D}	E. D. Schejter, Weizmann Institut, Rehovot, Israel

Proteintrap-Linien

Argk::GFP	ZCL0785, Flytrap
Argk::GFP	YB0338, Flytrap
Sls::GFP	ZCL2144, Flytrap
Trol::GFP	L311 aus Proteintrap-Kollektion, C. Klämbt, Universität Münster, verwendet in Susic-Jung et al., 2012

Gal4-Treiber und Reporter

Twist-Gal4	zur Verfügung gestellt von A. Michelson, NHLBI, USA
DMef2-Gal4	Ranganayakulu et al., 1995
UAS-Dcr2;;DMef2-Gal4	BL25756
rp298-Gal4	Menon und Chia, 2001; Nose et al., 1998
Sns-Gal4	Stute et al., 2006
1151-Gal4	Roy und VijayRaghavan, 1997
C855a-Gal4	BL6990
c381-Gal4	zur Verfügung gestellt von I. Reim, Universität Erlangen
sns-mCherryNLS	Haralalka et al., 2011

UAS-Linien

UAS-Doc2	zur Verfügung gestellt von I. Reim, Universität Erlangen
UAS-mCD8-GFP	BL32186
UAS-Lifeact-GFP	BL35545
UAS-mCherryNLS	BL38424
UAS-GFP	BL1521
UAS-GFP-NLS	BL4776
UAS- <i>duf</i> -RNAi	v3111
UAS- <i>sns</i> -RNAi	v109442
UAS- <i>hbs</i> -RNAi	v40898
UAS- <i>rst</i> -RNAi	v951

4.1.12. Sonstige Materialien

Dumont Pinzetten	Mercateo, Köthen
Säulen für Midipräparation	JETSTAR 2.0 Columns, Genomed, Löhne
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Stahlkugeln	Roth, Karlsruhe
Whatman Filter	Sartorius AG, Göttingen
Hybond™-N Membran	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Pipetten	Gilson, USA
Glasbodenschale	MatTek Corporation, USA

4.1.13. verwendete Internet-Ressourcen und spezielle Software

Flybase	http://flybase.bio.indiana.edu
SMART	http://www.smart.embl-heidelberg.de/smart
Sequenzvergleich	http://www.ebi.ac.uk./Tools/Clustalwz
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
Primerdesign	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
Bildkomposition	GIMP 2.8
Erstellung der Diagramme	Microsoft Excel 2010

4.2. Molekularbiologische Methoden**4.2.1. Isolation genomischer DNA**

Um die genomische DNA zu isolieren, werden ca. 15, zuvor 10 min bei -80 °C eingefrorene, 1 bis 3 Tage alte Fliegen in 400 µl frisch angesetztem Puffer A mit Stahlkugeln in einem

Eppendorf-Gefäß durch Schütteln homogenisiert. Der Ansatz wird 30 min bei 65 °C inkubiert, 230 µl 5 M KAc-Lösung sowie 570 µl 6 M LiCl-Lösung zugesetzt und für 10 min auf Eis gelagert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 13000 upm wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch kurzes Aufschütteln mit 800 µl Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Im Anschluss an das Zentrifugieren bei 13000 upm für 10 min wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für mindestens 5 min wird das entstandene Pellet kurz getrocknet, in 75 µl Wasser aufgenommen und für mindestens 3 h leicht geschüttelt, um die DNA vollständig zu resuspendieren.

4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit einer thermostabilen DNA-Polymerase und dem Wechsel aus Erhitzen und Abkühlen können durch spezifisch bindende Oligonukleotide (Primer) definierte DNA-Fragmente exponentiell vervielfältigt werden (Saiki et al., 1988). Als DNA-Polymerase wird „Accu Prime High Fidelity“ verwendet, wobei für PCR an Plasmiden Puffer I und für PCR an genomischer DNA Puffer II zum Einsatz kommt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

10x PCR Puffer: 5 µl
 Primer (10 µM): je 1 µl
 Template-DNA: 0,2-2 µl Plasmid / 5-10 µl genomische DNA
 Wasser: ad 50 µl
 Accu Prime Taq: 0,2 µl

PCR-Programm:

1. initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2. Denaturierung	30 sek	94 °C
3. Annealing	30 sek	T _m , siehe 4.1.6
4. Elongation	pro 1 kb 1 min	68 °C
30 bis 35-mal Schritt 2 bis 4		
5. abschließende Elongation	10 min	68 °C
bis zur Entnahme der Proben		4 °C

Die Überprüfung erfolgt durch gelelektrophoretische Auftrennung von 2 bis 5 µl des PCR-Produkts.

4.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, werden diese im Agarose-Gel unter Einwirkung eines Gleichstromfeldes elektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechend der erwarteten Größe wird hierfür 0,8 bis 1,5 % Agarose in 1x TBE durch Erhitzen gelöst. Um die DNA im Anschluss im UV-Licht sichtbar zu machen, wird zusätzlich 0,001 % Ethidiumbromid zugesetzt. Nach dem Erstarren der flüssigen Agarose-Lösung in der Elektrophorese-Apparatur wird das Gel mit 1x TBE Laufpuffer bedeckt, die mit Auftragspuffer versetzten DNA-Proben in die vorbereiteten Geltaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung von 80 bis 100 V die DNA aufgetrennt. Das Voranschreiten kann durch einen dem Auftragspuffer zugesetzten Farbstoff verfolgt werden. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente dient ein zusätzlich aufgetragener Standard-DNA Größenmarker.

4.2.4. Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der Ligation in einen Vektor werden aus PCR-Produkten entweder mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit oder dem illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Puffer- und Oligonukleotid-Reste entfernt. PCR-Produkte, die nach elektrophoretischer Auftrennung eine klare Bande zeigen, werden direkt eingesetzt. Sind durch PCR zusätzlich unerwünschte Produkte entstanden, wird das gesamte Produkt in der Gelelektrophorese aufgetrennt, das Ziel-Fragment ausgeschnitten und die DNA im Gel-Blöckchen mit den genannten Kits im Anschluss aufgereinigt.

4.2.5. Ligation von PCR-Produkten in TOPO®-Vektoren

Zur direkten Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Zwischenvektor ohne Zuhilfenahme von DNA-Ligase werden kommerziell verfügbare TOPO®-Vektoren genutzt. Am 3'-Ende eines solchen linearisierten Vektors ist kovalent eine Topoisomerase gebunden, die für die Ligation der DNA-Fragmente sorgt. Der Vektor pCR®II-TOPO® wird für die schnelle Ligation von PCR-Produkten genutzt und trägt eine Resistenz für das Antibiotikum Ampicillin. Der pENTR™/D-TOPO®-Vektor findet Verwendung bei der Klonierung von PCR-Produkten, die im Anschluss in den „Gateway“-Endvektor umkloniert werden. Zur gerichteten Integration muss das zu ligierende PCR-Fragment am 5'-Ende mit der Basenfolge „CACC“ beginnen. Der Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenz. Die Ligation von zuvor aufgereinigten PCR-Produkten erfolgt nach Anleitung des pCR®II-TOPO®- bzw. pENTR™

Directional TOPO[®] Cloning Kits. Im Anschluss erfolgt die Transformation des Ligationsansatzes wie unter 4.2.7 beschrieben.

4.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten aus dem pENTR[™]/D-TOPO[®]-Vektor in „Gateway“-Vektoren

Zur Umklonierung von DNA-Fragmenten aus dem pENTR[™]/D-TOPO[®]-Vektor in einen geeigneten „Gateway“-Endvektor wird der Gateway[®] LR Clonase II Enzyme Mix verwendet und nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

D-TOPO-Vorklon:	50-150 ng
„Gateway“-Vektor:	150 ng
Wasser:	ad 8 µl
LR Clonase II Enzyme Mix:	2 µl

Der Ansatz wird für 1 h bei 25 °C inkubiert und durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation bei 37 °C für 10 min gestoppt. Im Anschluss wird der Ligationsansatz, wie in 4.2.7 beschrieben, in chemisch kompetente Zellen transformiert.

4.2.7. Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Zellen

Um Plasmide zu vervielfältigen, werden sie in chemisch kompetente *E. coli* transformiert und vermehrt. 1 bis 2 µl eines Ligationsansatzes oder 0,2 bis 0,5 µl Plasmid-DNA werden hierfür den aufgetauten, chemisch kompetenten Zellen zugefügt, durch vorsichtiges Schütteln gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Nun erfolgt die Hitzeschock-Behandlung für 45 sek bei 42 °C. Im Anschluss werden 250 µl vorgewärmtes LB-Medium den Zellen zugegeben und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen werden auf einer LB-Medium Agarplatte, die mit dem passenden Antibiotikum versetzt ist, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne, gewachsene Kolonien werden nun in 3 µl LB-Medium unter Zusatz des geeigneten Antibiotikums über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

4.2.8. Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)

1,5 ml einer *E. coli* Flüssigkultur werden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben, die Zellen durch kurze Zentrifugation auf dem Gefäßboden gesammelt und der Überstand verworfen. Das Pellet wird im Anschluss in 100 µl E1-Lösung resuspendiert, 200 µl E2-Lösung zugefügt, invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Nun werden

150 µl E3-Lösung zugesetzt, der Inhalt des Reagiergefäßes vermischt und 4 min bei 13000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, 320 µl Isopropanol zugefügt und 30 min bei Raumtemperatur mit 13000 upm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wird es in 25 µl Wasser aufgenommen. Durch enzymatischen Restriktionsverdau gemäß der Anleitung des Herstellers kann im Anschluss festgestellt werden, ob das isolierte Plasmid das gewünschte DNA-Fragment enthält.

4.2.9. Isolation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad im präparativen Maßstab (Midipräparation)

Die zuvor im analytischen Maßstab identifizierte Kultur mit dem gewünschten Plasmid wird in 50 ml LB-Medium unter Zusatz des geeigneten Antibiotikums über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37 °C vermehrt. Die *E. coli* Kultur wird nun in einem 50 ml Falcon-Gefäß bei 4 °C und 4000 upm sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml E1-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml E2-Lösung und vorsichtigem Durchmischen durch Invertieren des Gefäßes wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Nun werden 4 ml E3-Lösung zugesetzt und es erfolgt die Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 6000 upm. Im Anschluss wird der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml E4-Lösung äquilibrierte Säule gegeben und diese dann zweimal mit jeweils 10 ml E5-Lösung gewaschen. Danach erfolgt die Elution der DNA mit 5 ml E6-Lösung, wobei das Eluat in einem 15 ml Falcon-Gefäß aufgefangen wird. Zur Fällung der DNA wird dem Eluat 4 ml Isopropanol zugefügt, das Gemisch auf 4 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und für 30 min bei 4 °C und 13000 upm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4 °C erneut zentrifugiert. Nun wird der Überstand verworfen, die Pellets getrocknet und in jeweils 30 µl Wasser resuspendiert. Zur Überprüfung des isolierten Plasmids erfolgt ein Restriktionsverdau mit passenden Endonukleasen nach Anleitung des Herstellers.

4.2.10. Isolation von Gesamt-RNA aus Myoblasten von Genitalscheiben

Ca. 20 männliche Genitalscheiben von Puppen des Genotyps DMef2 >> mCD8-GFP werden im gewünschten Alter unter möglichst RNase-freien Bedingungen in Schneider's-Medium (Schneider, 1972) präpariert und auf Eis gesammelt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine

Fettzellen mit überführt werden. Im Anschluss werden die Genitalscheiben dreimal mit 150 µl Cell Dissociation Buffer gewaschen. Der Puffer wird nun vorsichtig abgenommen und die Genitalscheiben für etwa 5 min mit 15 µl Elastase (5 mg/ml in Cell Dissociation Buffer) unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur dissoziiert, bis keine Zellhaufen mehr sichtbar sind. Währenddessen werden die Beads vorbereitet: 10 µl der magnetischen Beads (Dynabeads® Mouse CD8 (Lyt2)) werden in 1 ml Cell Dissociation Buffer resuspendiert, für 1 min in die Magnethalterung gegeben, der Puffer abgesaugt und die Beads in 10 µl Cell Dissociation Buffer aufgenommen. Die dissoziierten Genitalscheiben werden nun mit 170 µl gekühltem Cell Dissociation Buffer und den gewaschenen Beads für 20 min leicht bewegt und dabei kühl gelagert. Nun wird das Gefäß mit den Zellen dreimal für jeweils 2 min in die Magnethalterung gestellt, der Überstand abgezogen und mit je 1 ml Cell Dissociation Buffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgt direkt die RNA-Isolation mittels RNeasy Micro Kit oder RNeasy Micro Kit nach Anleitung aus dem jeweiligen Kit.

Die Dissoziation der Genitalscheiben kann alternativ auch mit Collagenase durchgeführt werden. Hierfür werden die Genitalscheiben in 50 µl Collagenase-Lösung (2 mg/ml in Grace's Medium) für 30 min inkubiert. Dabei wird das Gefäß hin und wieder geschüttelt und am Ende die Zellsuspension vorsichtig auf und ab pipettiert, um letzte Zellhaufen aufzulösen.

4.2.11. Herstellung von RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen

Zur Synthese von Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden, die später *in situ* mit der komplementären mRNA hybridisieren und über ihren DIG-Anhang detektiert werden können, werden 5 µl des spezifischen Template-Plasmids mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Nun wird eine Ethanol-Fällung wie folgt durchgeführt: Zuerst werden 2,5 Volumenanteile eiskalten Ethanols (reinst) und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung zugefügt und das Gemisch 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die gefällte DNA für 30 min bei 4 °C und 13000 upm zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in ca. 20 µl Wasser resuspendiert wird.

Reaktionsansatz der Sondensynthese:

Linearisierte, gefällte DNA:	5 µg
Transkriptionspuffer:	2 µl
DIG-RNA-Labeling-Mix	2 µl
entsprechende RNA-Polymerase:	1 µl
Wasser:	ad 20 µl

Zur Sondenherstellung wird der Reaktionsansatz 2 h bei 37 °C inkubiert und eine erneute Ethanolfällung durchgeführt. Die Sonde wird im Anschluss in 50 µl Wasser aufgenommen.

4.2.12. Überprüfung der RNA-Sonden mittels Spot-Test

Aus einer Verdünnungsreihe der Sonde (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) werden je 1 µl auf eine Nitrocellulose-Membran gegeben. Im Anschluss erfolgt das UV-Crosslinking und die Membran wird kurz mit DIG1 sowie 5 min mit PBT gewaschen. Es folgt der Nachweis der Sonde durch Inkubation der Membran mit anti-DIG Antikörper (1:5000 in DIG1) für 30 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wird die Membran zweimal kurz mit DIG1 gewaschen und in 2 ml DIG3, unter Zugabe von 10 µl NBT und 10 µl X-Phosphat gefärbt, bis eine ausreichende Färbung entsteht. Zum Abstoppen der Reaktion wird die Membran mit Leitungswasser gespült und kann im Anschluss getrocknet werden. Die Färbungsintensität der verschiedenen Verdünnungsstufen lässt auf die später zu verwendende Verdünnung der Sonde schließen.

4.2.13. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Messung des Nukleinsäure-Gehalts einer Lösung erfolgt mittels NanoDrop 2000 Spektrometer. Hierfür wird die optische Dichte von 1 µl Lösung im Vergleich zum zuvor gemessenen Referenzwert (in der Regel 1 µl Wasser) bei 260 nm bestimmt. Aus dem auf dem Gerät dargestellten Absorptionsspektrum lässt sich die Reinheit der Lösung abschätzen: Verunreinigungen durch anorganische Salze zeigen ein Absorptionsmaximum bei 230 nm wobei gelöste Proteine ein Maximum bei 280 nm besitzen. Ist das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten von 260 nm zu 280 nm für gemessene DNA bei 1,8 bzw. 2,0 bei RNA, so handelt es sich um eine reine Nukleinsäure-Lösung.

4.3.Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.3.1. Zucht und Haltung von Stämmen

Die Haltung der Fliegen erfolgt in Kunststoffflaschen, die mit milbendichten Stopfen verschlossen sind, in Klimakammern bei 18 °C oder 25 °C. Als Nahrung dient Maisgries-Agar am Boden der Flaschen. Zur Betrachtung und Selektion der Tiere werden sie kurzzeitig mit CO₂ betäubt. Vor Präparation von Adulten, werden die Fliegen mit Diethylether narkotisiert.

4.3.2. Überprüfung der Fertilität adulter Fliegen

Zur Bestimmung der Zeugungsfähigkeit wurden jeweils drei wildtypische Fliegen sieben Tage lang mit einzelnen Fliegen des zu überprüfenden Genotyps auf Maisgries-Agar Flaschen bei 25 °C gehalten. Die Elterntiere wurden nach 7 Tagen aus den Flaschen entfernt und nach weiteren sieben Tagen ausgewertet, ob Nachkommen entstanden sind.

4.3.3. Auswahl von Puppen definierten Alters

Um Puppen mit definiertem Alter zu präparieren, werden Tiere im Vorpuppenstadium (0 h APF), erkennbar an der hellen Färbung der Vorpuppe, aus der Fliegenflasche abgesammelt und in einer Petrischale mit angefeuchtetem Whatman-Filterpapier für die gewünschte Zeit bei 25 °C inkubiert. Bei einer Inkubation bei 18 oder 29 °C verläuft die Entwicklung langsamer bzw. schneller. Eine „Umrechnung“ der Entwicklungszeiten ist möglich (Atreya und Fernandes, 2008), siehe dafür Punkt 8.4 im Anhang. Werden nur männliche Puppen benötigt, können diese im Vorpuppen-Stadium anhand der durchscheinenden Testes auf der lateralen Seite im hinteren Drittel des Abdomens identifiziert und selektioniert werden.

4.3.4. Präparation von adulten oder pupalen männlichen Reproduktionssystemen

Die betäubten Fliegen werden auf einer Kunststoff-Schale in einen Tropfen PBS getaucht und die Reproduktionssysteme mit Hilfe von feinen Pinzetten unter dem Binokular heraus präpariert. Zur Präparation von pupalen Genitalscheiben oder Testes werden die Puppen in einem Tropfen PBS in der Körpermitte halbiert und der Inhalt des posterioren Endes heraus gedrückt. Bei Bedarf werden die den nun freiliegenden Organen anhaftenden Fettzellen mit einer feinen Nadel entfernt.

Die so präparierten Gewebe können im Anschluss direkt mikroskopisch analysiert werden (entweder in einer Glasbodenschale oder eingebettet in einem Tropfen PBS) oder es folgt die Fixierung mit Formaldehyd für Antikörpernachweise.

4.3.5. Immunfluoreszenz-Analysen an pupalen oder adulten männlichen Reproduktionstrakten

Proteine können histochemisch mittels spezifischer Erst-Antikörper nachgewiesen werden. Durch einen Zweit-Antikörper, der den Erstantikörper spezifisch bindet, wird das Signal verstärkt und durch dessen detektierbaren Anhang sichtbar gemacht.

Die präparierten Gewebe werden in Blockschälchen 20 min in frisch angesetztem 4 % Formaldehyd in PBT fixiert und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Es folgen 3 Waschschrte mit PBT für 20 min sowie die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Bei Bedarf kann im Anschluss eine zusätzliche Färbung mit Hoechst und/oder Phalloidin erfolgen. Die Gewebe werden im Anschluss direkt und ohne zusätzliches Einbetten mikroskopisch ausgewertet. Ab der Inkubation mit den Zweit-Antikörpern sind die Gewebe im Dunkeln aufzubewahren.

4.3.6. Nachweis von DNA-Replikation in Puppen mittels EdU-Injektion

Um in *Drosophila* Puppen die mitotischen Zellen zu markieren, wird 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) genutzt und mittels Click-iT Reaktion nachgewiesen (genutztes Kit: Click-iT EdU Alexa Fluor 594). Dafür werden Puppen definierten Alters auf doppelseitigem Klebeband fixiert und gegen Verrutschen auf der Rückseite mit einem Messingblöckchen gesichert. Die Puppen werden nun mit Voltalef-Öl überschichtet und die EdU-Lösung, bestehend aus 0,5 mM in PBS und 0,25 % Toluidinblau zur besseren Visualisierung, mittels Mikroinjektion direkt eingebracht. Anschließend wird das Injektions-Öl, soweit möglich, entfernt, die Puppen für die gewünschte Zeit bei 25 oder 29 °C gehalten und danach die Organe von Interesse präpariert. Nun erfolgen die Fixierung der Gewebe und der EdU-Nachweis gemäß der Anleitung des Herstellers. Soll parallel GFP detektiert werden, so ist darauf zu achten, dass ein anti-GFP Antikörper vor der EdU-Nachweisreaktion verwendet wird.

4.3.7. F-Aktin Nachweis mit Phalloidin und DNA-Färbung

Für die fluoreszente Markierung von F-Aktin wird das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Knollenblätterpilz-Toxin Phalloidin genutzt. Zur Färbung der DNA wird der Farbstoff Hoechst 33258 verwendet, der nach Interkalation in die DNA im Fluoreszenzlicht sichtbar wird. Für die Färbung mit Phalloidin oder Hoechst werden die pupalen oder adulten Reproduktionsorgane 10 min mit PBT gespült, 20 min mit der jeweiligen Lösung inkubiert und anschließend mindestens dreimal für 20 min gewaschen. Dies kann sowohl an fixierten als auch an frisch präparierten Geweben erfolgen.

4.3.8. *ex vivo* Kultur von pupalen Genitalscheiben und Testes

In Schneider's Medium präparierte pupale Genitalscheiben werden gemeinsam mit den dazugehörigen Testes in einzelnen Wells einer 18-Well Platte mit 2 mL Schneider's Medium, 0,5 % Insulin und 10 % FBS für bis zu 6 h bei 25 °C in Kultur gehalten. Kulturversuche in Glasbodenschalen waren bisher nicht erfolgreich. Zum Nachweis der Weiterentwicklung *ex vivo* kann dem Kulturmedium 0,1 mM EdU zugesetzt werden. Der Nachweis des EdU erfolgt nach Fixierung gemäß der Anleitung des Herstellers.

4.3.9. Sammeln von Fliegenembryonen

Zum Absammeln von Embryonen werden die Elterntiere auf mit Trockenhefe bestreute Fruchtsaftagar-Flaschen oder -Schalen gesetzt und nach der gewünschten Ablagezeit auf neue Fruchtsaftflaschen übertragen. Die Ablageflaschen werden auf 4 °C gelagert und die Embryonen nach maximal 3 Tagen Lagerung fixiert.

4.3.10. Entfernen des Chorions von Embryonen

Die Embryonen auf Fruchtsaftagar werden mit einem Pinsel und TNX abgelöst und in kleine Netzchen überführt. Nun werden die Embryonen kurz mit TNX gewaschen und für etwa 3 min in 50 % Klorix/TNX getaucht, um das Chorion abzulösen. Das Ablösen des Chorions ist an der glänzenden Oberfläche der Embryonen unter dem Binokular erkennbar. Die Reaktion wird durch Spülen mit TNX beendet.

4.3.11. Fixieren von Embryonen mit Formaldehyd

Die dechorionisierten Embryonen werden in einem Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Heptan und 500 µl frisch angesetztem 4 % Formaldehyd in PBS für 15 min stark schüttelnd inkubiert. Die fixierten Embryonen ordnen sich dabei an der Phasengrenze an. Nach Entfernen zuerst der unteren, dann der oberen Phase erfolgt mehrfaches Waschen mit Heptan, um Formaldehyd-Reste zu entfernen. Im Anschluss wird die Vitellinmembran entfernt, indem die Embryonen mit 500 µl Heptan und 500 µl Methanol für ca. 1 min stark gevortext werden. Nachdem die Embryonen abgesunken sind, wird der Überstand abgezogen, die Embryonen mit Methanol gewaschen und bei 4 °C gelagert. Vor der weiteren Verwendung müssen die auf diese Weise fixierten Embryonen durch mehrfaches Waschen mit PBT rehydriert werden.

4.3.12. Immunhistologische Färbung an Embryonen nach der ABC-Methode

Zu Beginn wird der Erst-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4 °C auf den Embryonen inkubiert. Es folgen drei 10-minütige Waschschrte mit PBT sowie die Inkubation mit 2 % Ziegen- oder Pferdeserum in PBT für 1 h, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nun wird der zuvor präadsorbierte biotinylierte Zweit-Antikörper ebenfalls für 1 h inkubiert und der überschüssige Antikörper durch 3 Waschschrte mit PBT für je 10 min entfernt. Der AB-Komplex (zuvor 30 min inkubiert, 1000 µl PBT, 10 µl Lösung A und 10 µl Lösung B, Vectastain ABC-Kit) wird daraufhin auf den Embryonen für 30 min inkubiert. So entsteht ein Komplex aus Avidin (A) und biotinylierter Meerrettichperoxidase (B) am Zweit-Antikörper der die folgende enzymatische Reaktion verstärkt. Nach erneuten 3 Waschschrten von je 10 min mit PBT werden die Embryonen in Blockschälchen in 1000 µl PBT, 10 µl Diaminobenzidin (DAB, 10 mg/ml), 5 µl H₂O₂ (0,3 %) und optional 2 µl NiCl₂ (10 %) bis zur gewünschten Stärke der Farbreaktion inkubiert. Das DAB wird dabei durch das zugefügte H₂O₂ oxidiert, was in Anwesenheit von NiCl₂ zu einer schwarzen Färbung führt. Anschließend werden die Embryonen gründlich mit PBT gewaschen, um die Färbung abzustoppen. Die gefärbten Embryonen werden nun wie unter 4.3.16 beschrieben entwässert und in Epon eingebettet.

4.3.13. Fluoreszente immunhistologische Färbung an Embryonen

Nach dem Rehydrieren der Embryonen wird der Erst-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit PBT für 10 min sowie die Inkubation mit 2 % Ziegen- oder Pferdeserum in PBT für 1 h. Im Anschluss werden die fluoreszenten Zweit-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgen 3 Waschschrte mit PBT für 10 min und das Einbetten in Fluoromount G[™]. Ab der Inkubation mit den Zweit-Antikörpern sind die Embryonen, soweit möglich, im Dunkeln aufzubewahren.

4.3.14. *in situ*-Hybridisierung an Embryonen

Über eine Waschreihe (Verhältnis 3:1, 1:1, 1:3 PBT:HS, je 10 min) werden die Embryonen in Hybridisierungslösung (HS) überführt und dreimal 5 min mit HS gespült. Im Anschluss werden 100 µl heiße HS auf die Embryonen gegeben und der Ansatz bei 55 °C für 1 h prähybridisiert. Parallel dazu wird die RNA-Sonde vorbereitet, indem die mit HS um den gewünschten Faktor verdünnte Sonde für 3 min bei 80 °C erhitzt wird. Die vorbereitete Sonde

wird bis zur Hybridisierung auf Eis gelagert. Nach Prähybridisierung der Embryonen wird die Sonde zugefügt und über Nacht bei 55 bis 60 °C hybridisiert. Im Anschluss werden die Embryonen mit vorgewärmter HS gespült und 15 min mit warmer HS gewaschen. Die Embryonen werden nun weiterhin bei der Hybridisierungstemperatur über eine Waschreihe in PBT überführt (1:3, 1:3 3:1 HS:PBT, je 15 min), viermal kurz mit warmem PBT gewaschen und daraufhin auf Raumtemperatur abgekühlt. Der zuvor präadsorbierte anti-DIG Antikörper (alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelt, finale Konzentration: 1:2000) wird dann für 1 h bei Raumtemperatur auf den Embryonen inkubiert und durch fünfmaliges Waschen mit PBT (je 20 min) ausgewaschen. Nun folgen 3 Waschschrte in Färbepuffer sowie die Überführung der Embryonen in ein Blockschälchen. Zum Färbepuffer werden im Anschluss NBT und X-Phosphat (beide in einer Endkonzentration von 3,5 % (w/v)) gegeben und die Färbung erfolgt, wobei das Voranschreiten in regelmäßigen Zeitabständen zu kontrollieren ist. Die Farbreaktion kann durch Inkubation bei 37 °C beschleunigt werden. Bei ausreichender Intensität der Färbung wird die Reaktion durch gründliches Waschen mit PBT abgestoppt und die Embryonen wie in Punkt 4.3.16 beschrieben, eingebettet.

4.3.15. Fluoreszente *in situ*-Hybridisierung (FISH) an Embryonen mit kombiniertem Immunofluoreszenz-Antikörperrnachweis

Zum fluoreszenten Nachweis von Transkripten mit kombiniertem Protein-Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurde ein existierendes Protokoll (Lecuyer et al., 2008) wie folgt adaptiert. Alle Schritte werden dabei in dünnwandigen 0,5 µl Gefäßen durchgeführt.

Die Embryonen werden für 20 min in 4 % Formaldehyd in PBT refixiert und dreimal kurz mit PBT erneut gewaschen. Nun folgt eine Behandlung mit Proteinase K (Endkonzentration 3µg/ml in PBT) für bis zu 13 min bei Raumtemperatur und 1 h auf Eis. Bei einer kürzeren Proteinase K Einwirkung bei Raumtemperatur ist das spätere Eindringen der RNA-Sonde in das Gewebe deutlich verschlechtert, jedoch der Antikörperrnachweis verbessert. Im Anschluss wird der Verdau mit Proteinase K durch zweimal waschen für 2 min mit Glycin (2 mg/ml in PBT) gestoppt, zweimal mit PBT gespült und erneut 20 min mit 4 % Formaldehyd in PBT refixiert. Nach 5 kurzen Waschschrten mit PBT werden die Embryonen in HS überführt und direkt prähybridisiert oder bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Zur Prähybridisierung wird zuvor erhitzte HS auf die Embryonen gegeben und der Ansatz für mindestens 2 h bei 55 °C inkubiert. Die zuvor in der finalen Konzentration für 3 min bei 80 °C erhitzte und abgekühlte Sonde wird nun über Nacht bei 55 °C auf den Embryonen hybridisiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen mit vorgewärmter HS gespült und 15 min mit warmer

HS gewaschen. Die Embryonen werden nun weiterhin bei der Hybridisierungstemperatur über eine Waschreihe in PBT überführt (1:3, 1:3 3:1 HS:PBT, je 15 min), viermal kurz mit warmem PBT gewaschen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wird der anti-DIG Antikörper (biotinyliert, Endkonzentration: 1:2000) sowie die weiteren zu verwendenden Erst-Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen 6 Waschschrte mit PBT und zweimal mit PBS sowie die Inkubation mit TSA Fluorescein-Lösung für 2 h zur Detektion des anti-DIG Antikörpers. Nach erneuten 6 Waschschrten mit PBS werden die Embryonen mit den weiteren Zweit-Antikörpern für 2 h inkubiert, dreimal 10 min mit PBT gewaschen und in Fluoromount GTM eingebettet.

4.3.16. Herstellung von Embryonen-Dauerpräparaten mit Epon

Die Embryonen werden über eine aufsteigende Ethanol-Reihe entwässert und über Nacht in 100 % Ethanol gelagert. Nun werden die Embryonen in einem Tropfen des Ethanols auf einen Objektträger gegeben und mit einem Tropfen Epon überschichtet. Bei Bedarf können nun die Embryonen vorsichtig auf dem Objektträger verteilt werden. Das Deckgläschen wird im Anschluss luftblasenfrei aufgelegt. Die angefertigten Präparate müssen nun mindestens über Nacht bei 60 °C aushärten.

5. ERGEBNISSE

5.1. Analyse von Argk im Hinblick auf eine Funktion während der embryonalen Myogenese

5.1.1. Argk wird in der somatischen Muskulatur exprimiert

5.1.1.1. Zwei Proteintrap-Linien weisen auf eine Expression von Argk in der somatischen Muskulatur hin

Proteintrap-Linien von Argk wurden untersucht, um erste Hinweise auf die Zelltyp-spezifische Lokalisation und zeitliche Expression von Argk zu gewinnen. Bei einem Proteintrap wird ein P-Element, welches das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) mit angrenzenden Splicing-Donor- und -Akzeptor-Stellen enthält, zufällig in das *Drosophila*-Genom integriert. Erfolgt die Integration in einem Intron, so wird das GFP hier als artifizielles Exon in das Protein integriert (Morin et al., 2001). Zwei homozygot vitale Linien mit *GFP* Insertionen in *argk* wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Lokalisation der P-Elemente konnte durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden an genomischer DNA bestätigt werden (siehe Anhang, 8.2.2). Das GFP-Signal der Proteintrap-Linien wurde im Folgenden mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie analysiert, um Rückschlüsse auf die Expression von Argk ziehen zu können (Abb. 7). In einigen Fällen wurde die Muskulatur zusätzlich markiert mit anti- β 3-Tubulin. Beide Linien zeigten in den analysierten Geweben und Strukturen identische Muster in vergleichbarer Expressionsstärke.

In Embryonen im Stadium des zellulären Blastoderms konnte GFP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 7 A). Dies lässt darauf schließen, dass Argk bereits maternal bereitgestellt wird. Zum Zeitpunkt der Keimstreifelongation ist Argk::GFP im Zytoplasma nicht mehr sichtbar (Abb. 7 B), wird jedoch ab Einsetzen des Keimstreifrückzugs wieder nachweisbar (Abb. 7 C). In späteren Stadien ist das GFP-Signal in der somatischen Muskulatur detektierbar, wobei Argk::GFP ausschließlich in den Zellkernen der Muskelzellen nachweisbar ist (Abb. 7 D-F, Pfeile).

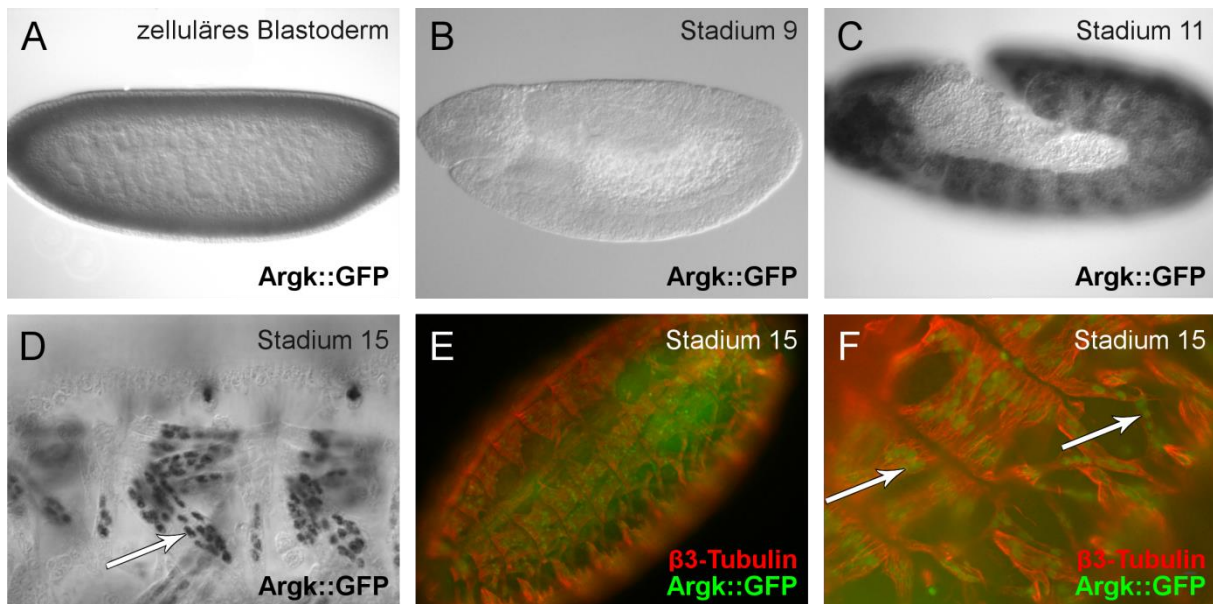


Abb. 7: Argk::GFP wird in der embryonalen Muskulatur während und nach der Myoblastenfusion exprimiert

Die Argk Proteintrap-Linie ZCL0785 zeigt GFP-Expression in der embryonalen Muskulatur. In frühen Stadien ist Argk::GFP im gesamten Embryo nachweisbar (A). Während der Keimstreifelongation lässt sich keine Expression von Argk::GFP detektieren (B). Ab Stadium 11 wird Argk::GFP erneut sichtbar (C), wobei die Lokalisation kurz im Zytoplasma nachzuweisen ist und sich in späteren Stadien auf die Zellkerne beschränkt (D-F). Pfeile zeigen auf GFP-positive Muskelzellkerne. Argk::GFP Fusionsprotein wurde mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers detektiert, die embryonale Muskulatur wurde in E+F mit anti-β3-Tubulin visualisiert.

Die Analyse der Proteintrap-Linien zeigt, dass Argk in der embryonalen Muskulatur während und nach der Myoblastenfusion exprimiert ist. Es ist nicht klar, ob das in Proteintraps beobachtete Verteilungsmuster von Argk::GFP mit der Expression des endogenen Proteins vergleichbar ist, da durch das zusätzliche GFP eine Fehllokalisation nicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von Argk auf subzellulärer Ebene durch eine alternative Methode untersucht.

5.1.1.2. Ein ektopisch exprimiertes Argk-Konstrukt lokalisiert an den Mitochondrien der somatischen Muskulatur

Bei den Komponenten der Myogenese konnte ein Zusammenhang zwischen subzellulärer Lokalisation und ihrer Funktion im Fusionsprozess beobachtet werden. Die Expression von Argk während der Myoblastenfusion konnte bereits gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.1.1.1), jedoch wird die in GFP-Proteintrap-Linien beobachtete Lokalisation im Zellkern als möglicherweise artifiziell angesehen. Daher wurden nun immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von ArgK zu klären. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen einen konservierten Teil von Creatinkinase war eine reproduzierbare Detektion von endogener Argk in *Drosophila* Embryonen jedoch nicht

möglich. Um die subzelluläre Lokalisation von Argk in den Myoblasten dennoch aufdecken zu können, wurde Argk ektopisch exprimiert und über einen terminalen Anhang nachgewiesen. Dafür wurde der gesamte offene Leserahmen von *argk* mit einem C-terminalen 10-fach Myc-Anhang versehen und mithilfe des UAS-Gal4 Systems aus *Saccharomyces cerevisiae* (Brand und Perrimon, 1993) in Myoblasten und den sich entwickelnden Muskeln exprimiert. Das Verteilungsmuster des Argk-Myc Fusionsproteins wurde im Anschluss mit einem anti-Myc Antikörper sichtbar gemacht.

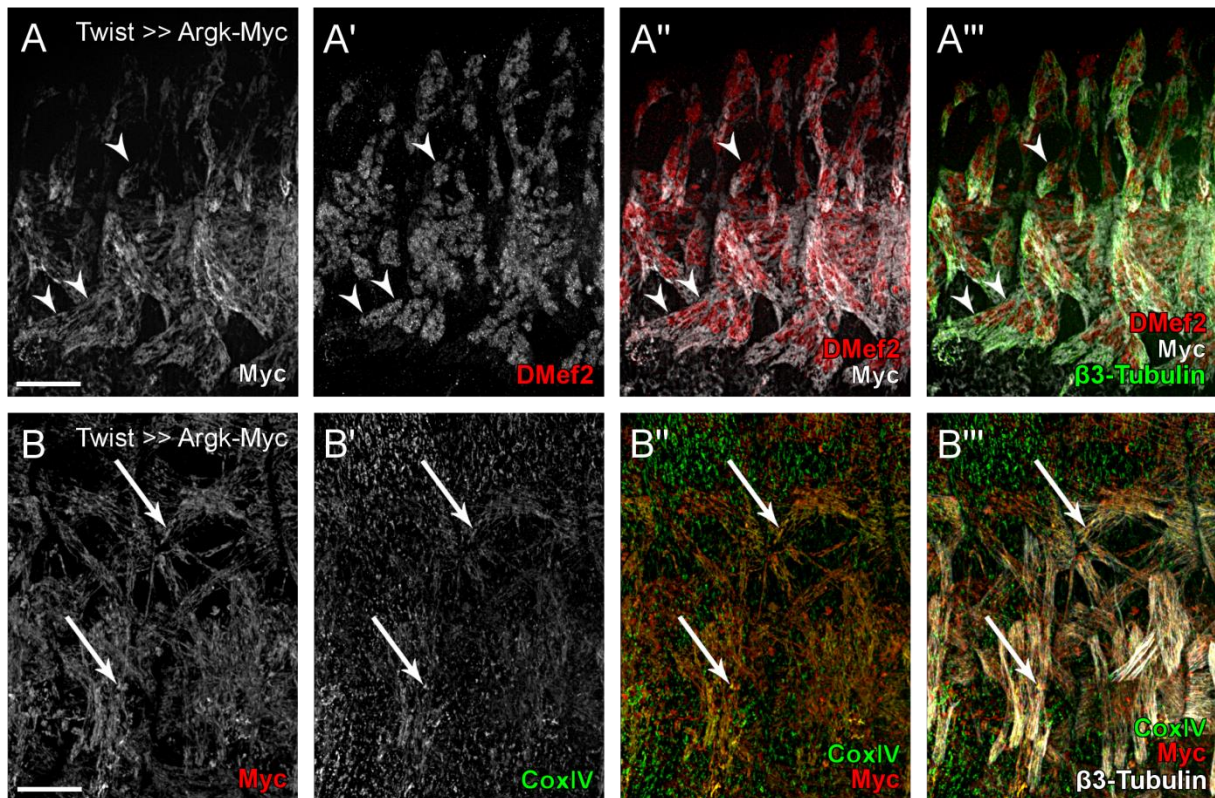


Abb. 8: Ektopisch exprimiertes Argk-Myc Fusionsprotein lokalisiert in zirkulären Strukturen im somatischen Mesoderm und kolokalisiert dort teilweise mit Mitochondrien

Expression des Argk-Myc Fusionsproteins mit Hilfe von *twist*-Gal4 in embryonaler Muskulatur. Argk-Myc lokalisierte in kreisförmigen Mustern nicht in Zellkernen, wenn es ektopisch in der embryonalen Muskulatur exprimiert wurde (A-A''', Pfeilköpfe zeigen auf Zellkerne). Eine Doppelfärbung von ektopisch exprimiertem Argk-Myc und Mitochondrien mit einem anti-CoxIV Antikörper zeigte eine partielle Kolokalisation in den Muskeln. (B-B''', Pfeile zeigen auf überlappende Bereiche). A, B: anti-Myc Nachweis des Argk-Myc Konstrukts. Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μ m

Der Nachweis des ektopisch exprimierten Argk-Myc zeigte zirkuläre Muster von variabler Größe innerhalb der entstehenden Muskeln und FCMs (Abb. 8 A und B). Eine Akkumulation an Zellkontakt-Stellen oder an der Membran wurde nicht beobachtet. Durch die Analyse der Argk::GFP Proteintrap-Linien bestehen Hinweise auf eine Lokalisation im oder am Zellkern. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Myoblasten-spezifische Transkriptionsfaktor DMef2 mittels spezifischem Antikörper markiert, um die Zellkerne sichtbar zu machen (Abb. 8 A-

A““). Der gleichzeitige Nachweis von DMef2 und Myc zeigte keine Kolokalisation (Abb. 8 A“, Pfeilköpfe). Demnach scheint ektopisch exprimiertes Argk-Myc nicht im Zellkern exprimiert zu sein. Phosphagene stehen im engen Kontakt mit Mitochondrien, da sie Energieeinheiten von Orten der Energieproduktion wie den Mitochondrien zu Orten des Energieverbrauchs transportieren. Um einen möglichen Zusammenhang von Argk mit Mitochondrien zu untersuchen, wurde der Mitochondrien-Bestandteil Cytochrom C OxidaseIV (CoxIV) im Twist-getriebenen Argk-Myc Hintergrund detektiert (Abb. 8 B-B““). Anti-CoxIV zeigte eine ubiquitäre Verteilung im gesamten Embryo, das sich in Punkten oder Kreisen darstellte (Abb. 8 B‘). Ein gleichzeitiger Nachweis von Argk-Myc und CoxIV zeigte eine partielle Kolokalisation in der entstehenden Muskulatur (Abb. 8 B“ und B““, Pfeile). Dies weist auf eine Lokalisation von ektopisch exprimierter Argk zum Teil an den Mitochondrien der Muskeln während der embryonalen Myogenese hin.

5.1.2. Die embryonale Myogenese verläuft unabhängig von Argk

5.1.2.1. argk wird unabhängig vom Voranschreiten der Myogenese transkribiert

Zuvor konnte gezeigt werden, dass *argk* während der Myogenese in FCMs und wachsenden Myotuben transkribiert wird (Kuckwa, 2010). Weiterhin bleibt fraglich, ob die Transkription vom Voranschreiten der Myoblastenfusion abhängt, oder ob sie unabhängig davon abläuft. In Embryonen mit homozygot defektem *sns*-Gen erfolgt keine Erkennung und Anheftung der FCMs an die FCs. Es kommt nicht zur Ausbildung von FuRMAS und einem F-Aktin Fokus, daher findet auch keine energieaufwändige Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts statt. Um festzustellen, ob die Transkription von *argk* von der Adhäsion der Myoblasten und dem damit verbundenen Voranschreiten der Myogenese abhängt, wurden fluoreszente *in situ*-Hybridisierungen (FISH) mit einer RNA-antisense-Sonde gegen *argk* an homozygoten *sns*-mutanten Embryonen durchgeführt (Abb. 9). Die Muskulatur wurde dabei mittels Antikörper gegen β 3-Tubulin markiert.

In wildtypischen Embryonen wurde mit FISH ein zur konventionellen *in situ*-Hybridisierung vergleichbares Transkriptionsmuster mit einer gegen *argk* gerichteten Sonde detektiert (vergleiche Abb. 9 A-A“ und Anhang, 8.4). Embryonen mit homozygotem *sns*²⁰⁻²³-Allel weisen starke Defekte in der Muskulatur auf, viele unfusionierte FCMs sind zwischen dünnen Muskeln sichtbar (Abb. 9 B). *argk*-Transkripte waren in diesen Embryonen weiterhin in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Intensität nachweisbar (Abb. 9 B‘ und B“). Aufgrund dieser

Daten wird geschlossen, dass keine Korrelation zwischen dem Ablauf der Myoblastenfusion und der Transkription von *argk* existiert.

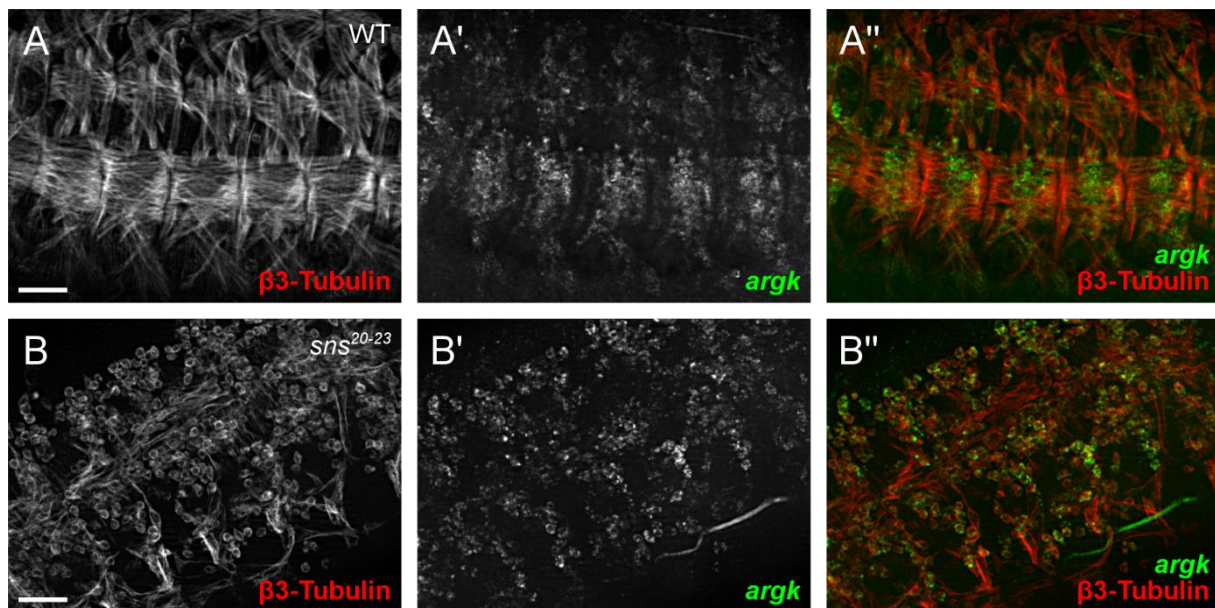


Abb. 9: *argk* wird in homozygot *sns*²⁰⁻²³-mutanten Embryonen transkribiert

FISH mit einer *argk* antisense RNA-Sonde wurde an wildtypischen Embryonen (A-A'') und an homozygot *sns*²⁰⁻²³-mutanten Embryonen (B-B'') durchgeführt. Das detektierte *argk*-Transkriptionsmuster in *sns*²⁰⁻²³-mutanten Embryonen ist mit dem Muster des Wildtyps vergleichbar. Die mit einem anti-β3-Tubulin Antikörper sichtbar gemachte Muskulatur ist in rot, und die RNA-Sonde in grün dargestellt. Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μm

5.1.2.2. Die Lokalisation des Argk-Myc Fusionsproteins in Embryonen mit beeinträchtigter Myoblastenfusion ist vergleichbar zum Wildtyp

Die Lokalisation von Proteinen mit Relevanz für die Myoblastenfusion ist häufig abhängig von anderen Komponenten der Signalkaskade. Das zuvor bereits verwendete Argk-Myc Konstrukt wurde nun mit dem Myoblasten-spezifischen Treiber DMef2 ektopisch in verschiedenen Fusionsmutanten exprimiert, um festzustellen, ob die Lokalisation von Argk durch das Fehlen von Myogenese-relevanten Faktoren beeinflusst wird. Dabei wurden Allele gewählt, bei denen die Myoblasten nicht mehr adhären (*sns*²⁰⁻²³, Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000), nach der erfolgreichen Adhäsion die Zellmembranen nicht auflösen (*blow*², Doberstein et al., 1997) oder während der Vesikulierung der Membranen stoppen (*wip*^{30D}, Massarwa et al., 2007). Die Muskulatur wurde erneut mit Hilfe eines anti-β3-Tubulin Antikörpers sichtbar gemacht (Abb. 10), das Argk-Myc Fusionsprotein mittels anti-Myc Antikörper.

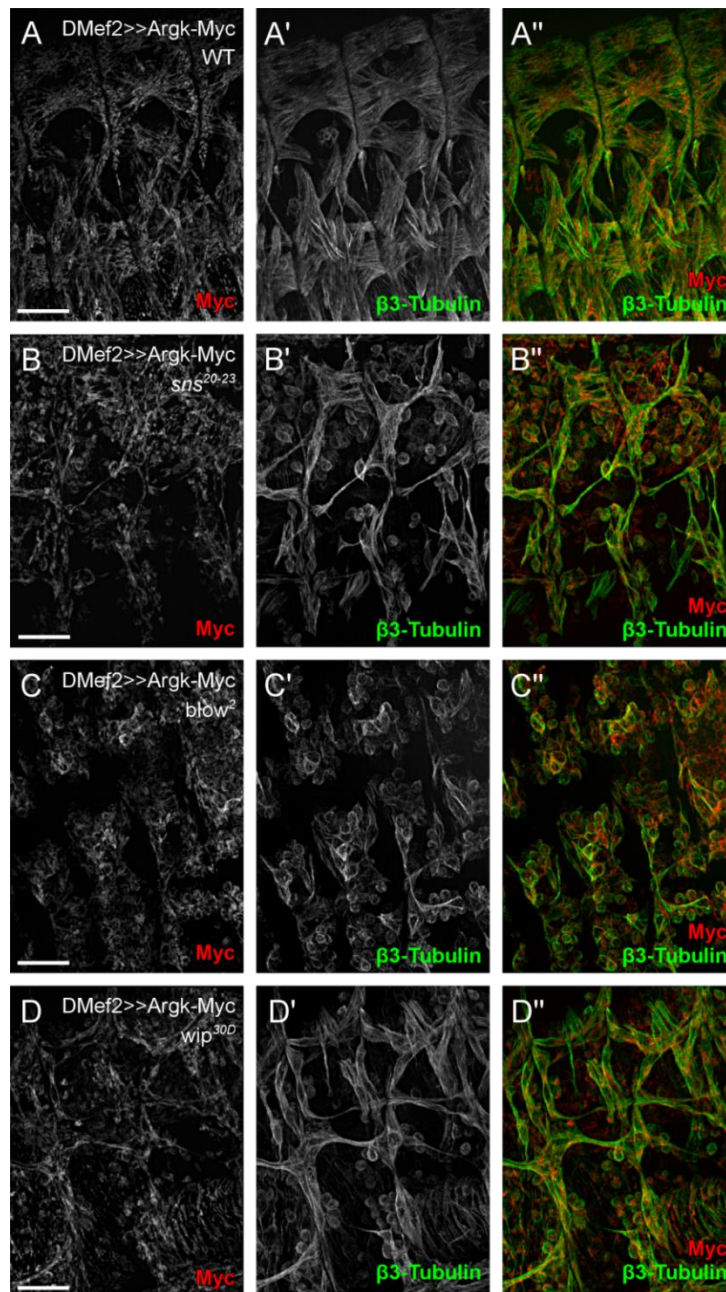


Abb. 10: Ektopisch exprimiertes Argk-Myc lokalisiert in *sns*²⁰⁻²³, *blow*² oder *wip*^{30D}-mutanten Embryonen in einem mit dem Wildtyp vergleichbaren Muster

Ein mit Myc-Anhang versehenes Argk-Konstrukt wurde mit DMef2-Gal4 ektopisch im Wildtyp (A-A''), in homozygoten *sns*²⁰⁻²³-mutanten Embryonen (B-B''), in homozygoten *blow*²-mutanten Embryonen (C-C'') sowie in homozygoten *wip*^{30D}-mutanten Embryonen (D-D'') exprimiert. Die Lokalisation von Argk-Myc unterscheidet sich nicht. Die Muskulatur wurde mit einem anti-β3-Tubulin Antikörper sichtbar gemacht (grün), die Lokalisation des Argk-Myc Fusionsprotein wurde mit einem anti-Myc Antikörper detektiert (rot). Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μm

Wie auch auf Transkript-Ebene war in *sns*²⁰⁻²³-mutanten Embryonen kein Unterschied zum wildtypischen Verteilungsmuster des Argk-Myc-Fusionsproteins zu erkennen (Abb. 10 B-B''). Die subzelluläre Lokalisation in kleinen, kreisförmigen Strukturen blieb weiterhin erhalten. Dies gilt auch für in *blow*² und *wip*^{30D}-mutanten Embryonen exprimiertes Argk-Myc

(Abb. 10 C-D“): trotz Fehlen von *Blow* oder *Wip* sowie Ausbleiben der Myoblastenfusion lokalisiert *Argk-Myc* wie im Wildtyp. Die Lokalisation von *Argk* ist daher wahrscheinlich unabhängig von den Myogenese-relevanten Proteinen *Sns*, *Blow* und *Wip*. Ein Zusammenhang zwischen Voranschreiten der Myoblastenfusion und subzellulärer Lokalisation von *Argk* scheint nicht zu bestehen.

5.1.2.3. Deletion, Über-Expression oder das Einbringen einer dominant-negativ wirkenden Proteinvariante von *Argk* führt nicht zu Defekten in der Muskelentwicklung

Hat ein Protein Einfluss auf die Myogenese, so führt sein Fehlen häufig zu Defekten im entstehenden Muskelmuster und zu embryonaler Letalität. Um festzustellen, ob der Verlust von *Argk* Störungen bei der Muskelentwicklung verursacht, wurde in verschiedenen *argk*-defizienten Embryonen mit anti- β 3-Tubulin Antikörper die Muskulatur sichtbar gemacht um sie auf Muskeldefekte hin zu analysieren (Abb. 11). Embryonen wurden im Stadium 16 untersucht, da zu diesem Zeitpunkt im Wildtyp die Myoblastenfusion weitestgehend abgeschlossen ist.

Die Fliegenlinie *Df(3L)BSC170* ist unter Anderem defizient für *argk* (siehe Anhang, 8.5). Homozygote Embryonen dieser Linie zeigten ein zum Wildtyp vergleichbares Muskelmuster, die Myoblastenfusion scheint normal zu verlaufen (Abb. 11 A). Einer weiteren *argk*-defizienten Linie, *Df(3L)BSC130*, fehlt neben *argk* das ebenfalls potentiell für eine Arginin-kinase kodierende Gen *CG5144* sowie die Gene *doc1*, *doc2* und *doc3* (siehe Anhang, 8.3 und 8.5). Die Deletion von *doc1*, *doc2* und *doc3* führt aufgrund des fehlenden Amnioserosa zu Defekten im Keimstreifrückzug (Reim et al., 2003). Mögliche Fusionsdefekte können daher in homozygot defizienten Embryonen nicht sicher erkannt werden (Abb. 11 B). Der Keimstreifrückzugsdefekt kann durch ektopische Expression von *Doc2* gerettet werden (Reim et al., 2003). Nach Rettung des Keimstreifrückzugs durch ektopische Expression von *Doc2* im Amnioserosa mittels *c381-Gal4* in Embryonen homozygot für *Df(3L)BSC130* war erkennbar, dass auch diese Embryonen keine Defekte in der Fusion der Myoblasten aufzeigen (Abb. 11 C). Die Deletionen in den hier untersuchten Fliegenlinien wurden mittels PCR an der genomischen DNA mit spezifischen Oligonukleotiden bestätigt. Sowohl das Fehlen von *argk* als auch der gleichzeitige Verlust von *argk* und dem möglichen Redundanzpartner *CG5144* führt demnach nicht zu einem vom Wildtyp unterscheidbaren Muskelmuster. In der transheterozygoten Situation von *Df(3L)BSC170* und *Df(3L)BSC130* (siehe Anhang, 8.5)

sind die Fliegen lebensfähig, bewegungsfähig, flugfähig und fertil. Muskeldefekte konnten in diesen Fliegen ebenfalls nicht beschrieben werden.

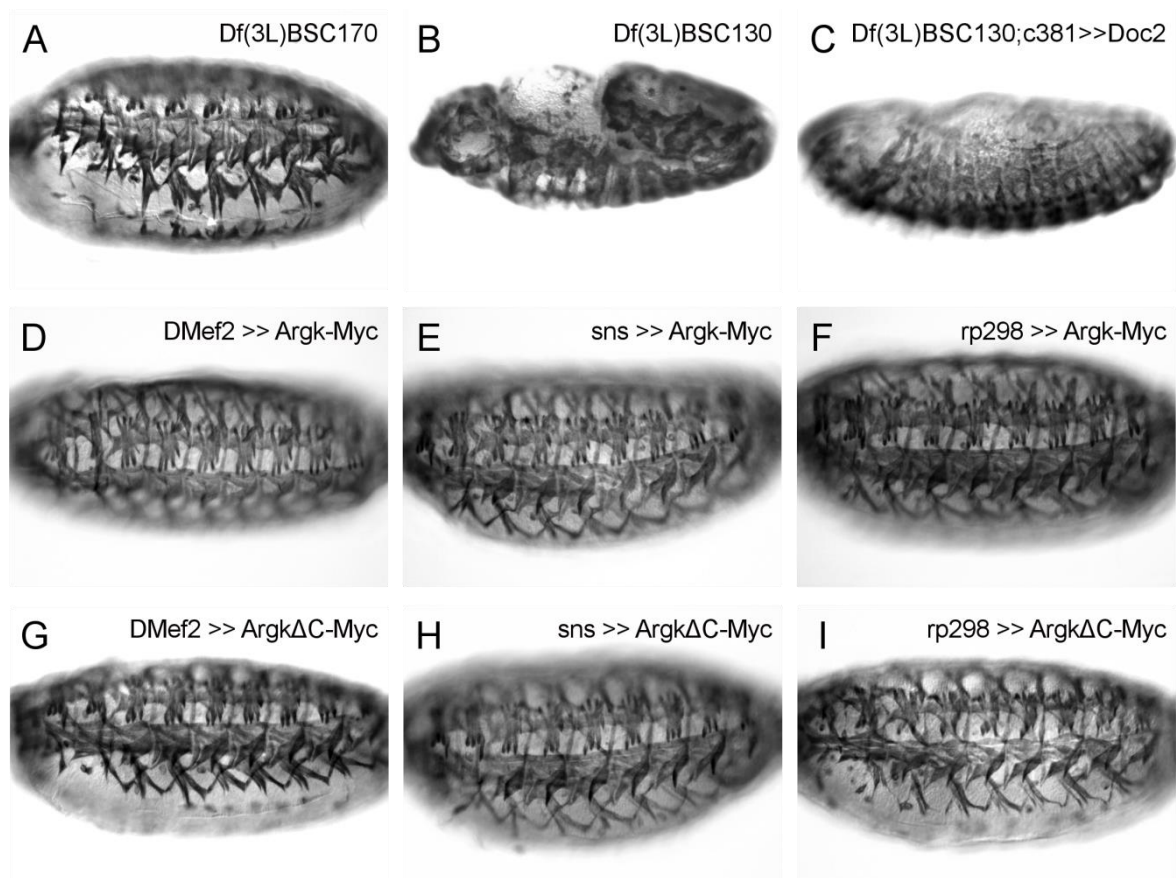


Abb. 11: Variation in der Menge von Argk und die Expression einer möglicherweise dominant-negativen Proteinvariante führt nicht zu Defekten in der embryonalen Muskulatur

In Embryonen im Stadium 16 wurde die Muskulatur mit anti- β 3-Tubulin Antikörper sichtbar gemacht. Das auf diese Weise detektierte Muskelmuster in *argk*-defizienten Embryonen der Linie Df(3L)BSC170 war mit dem Wildtyp vergleichbar (A). Homozygote Embryonen der Linie Df(3L)BSC130, eine Defizienz von *argk* und *CG5144* zeigte Defekte im Keimstreifrückzug aufgrund der Deletion von *doc1*, *doc2* und *doc3* (B). Nach Rettung des Keimstreifrückzugs-Phänotyps durch die ektopische Expression von Doc2 war ebenfalls kein Defekt der Myoblastenfusion zu beobachten (C). Die ektopische Expression von Argk-Myc in der gesamten Muskulatur (D), spezifisch in FCMs (E) oder in FCs/wachsenden Myotuben (F) führte zu keinen Defekten in der Muskelentstehung. Die Expression einer verkürzten Proteinvariante, die endogene Argk kompetitiv hemmen könnte, in allen Myoblasten (G), nur in FCMs (H) oder nur in FCs/wachsenden Myotuben (I) beeinflusst die Entwicklung der Muskulatur ebenfalls nicht.

Der Verlust eines fusionsrelevanten Gens führt nicht in allen Fällen direkt zu einer phänotypischen Veränderung in der entstehenden Muskulatur, kann jedoch durch die Änderung des Proteinlevels, z.B. durch einseitige Expression in FCs bzw. FCMs oder durch dominant-negativ wirkende Allele induziert werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012; Schäfer et al., 2007). Deshalb wurde Embryonen mit ektopischer Expression von Argk-Myc in den Myoblasten hinsichtlich ihres Muskelmusters untersucht: die Expression von Argk-Myc durch den Myoblasten-spezifischen Treiber DMef2-Gal4 zeigte keine sichtbaren Defekte in der

entstehenden Muskulatur (Abb. 11 D). Das Gleiche gilt, wenn Argk-Myc spezifisch in FCMs mittels Sns-Gal4 (Abb. 11 E) oder in FCs/wachsenden Myotuben durch rp298-Gal4 exprimiert wurde (Abb. 11 F).

Die zu Argk homologen Creatinkinasen liegen als Dimere in Vertebraten vor (Eppenberger et al., 1967). Zur Erzeugung einer Proteinvariante mit möglicherweise dominant-negativem Effekt wurden die ersten 421 Aminosäuren von Argk mit einem 10x Myc Anhang versehen. Dieser verkürzten Variante, im Folgenden als Argk Δ C-Myc bezeichnet, fehlt die NEED-Box, die „active site loop“ und die potentielle Adenin-Nukleotid Bindestelle. Argk Δ C-Myc kann nicht mehr als Kinase agieren und könnte so die wildtypische endogene Argk kompetitiv hemmen. Die Expression von Argk Δ C-Myc während der Myogenese, sowohl bei Expression in allen Myoblasten (Abb. 11 G) als auch bei Expression spezifisch in FCMs oder den FCs/wachsenden Myotuben mit sns-Gal4 bzw. rp298-Gal4 (Abb. 11 H und I), führte zu keinen erkennbaren Defekten während der Muskelentwicklung. Der Nachweis der verkürzten Proteinvariante mithilfe eines anti-Myc Antikörpers zeigte auf subzellulärer Ebene weiterhin die zum Argk-Myc Konstrukt vergleichbaren, zirkulären Strukturen (nicht gezeigt). Die Kinase-Aktivität scheint daher nicht für die korrekte Lokalisation des Proteins benötigt.

Weder die Über-Expression von Argk-Myc noch das Einbringen einer kompetitiv hemmenden Proteinvariante sorgte für Störungen in der Muskelentwicklung. Durch die vorliegenden Daten wird daher ein Einfluss von Argk auf die Myogenese als unwahrscheinlich erachtet.

5.2. Die Entstehung der Muskelschichten des männlichen Reproduktionssystems am Beispiel der Testismuskulatur

5.2.1. Die inneren Organe des männlichen Reproduktionstrakts sind umgeben von verschieden gestalteten Muskelschichten

Vorrangegangene Studien beschreiben Muskelschichten, welche die inneren Organe des männlichen Reproduktionstrakts umschließen (Bodenstein, 1950). Diese Muskelschichten wurden in Kooperation mit C. Hornbruch-Freitag und L. Susic-Jung (Philipps-Universität Marburg) genauer charakterisiert. Um die Muskelschichten zu analysieren, wurden Reproduktionstrakte einer Proteintrap-Linie präpariert, die ein *sls::GFP* Fusionsprotein exprimiert (Hudson et al., 2008). Die Isoformen von *sallimus* (*sls*) kodieren für verschiedene Sarkomer-Komponenten, z.B. das Z-Scheiben Element Kettin (Burkart et al., 2007). Die freipräparierten Gewebe wurden zusätzlich mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin inkubiert, um das F-Aktin der Filamente zu visualisieren (Abb. 12).

Testes (Abb. 12 A), Samenblasen (Abb. 12 B), Paragonien (Abb. 12 C) und Ductus ejaculatus (Abb. 12 D) sind jeweils von einer sehr dünnen Muskelhülle umgeben. Die Muskelschichten von Samenblase, Paragonium und Ductus ejaculatus unterscheiden sich kaum voneinander. Dünne, quergestreifte Muskelfasern umspannen dicht das jeweilige Organ (Abb. 12 B-D), die Z-Scheiben sind dabei klar als dünne Linie zu erkennen. Die einzelnen Muskeln der Paragonien weisen Querverbindungen auf (Pfeilköpfe in Abb. 12 C). Die Muskelschicht der Testes weicht in ihrer Filamentanordnung stark von denen der anderen untersuchten Organe ab (Abb. 12 A). Das typische Z-Scheiben Muster der quergestreiften Muskulatur ist nicht zu erkennen. Die Verteilung von *SlS::GFP* und Phalloidin weist ein gleichmäßiges Streifenmuster auf, das an glatte Muskeln erinnert (Abb. 12 A). Der Testis wird von der Muskelschicht lückenlos umschlossen, wobei sich keine einzelnen Muskeln abzeichnen. Einzig die Spermienpumpe besitzt dicke, tubuläre Muskeln (Abb. 12 E), in deren Mitte sich die Muskelkerne befinden (siehe Abb. 13 E). Die Muskulatur der Spermienpumpe ist bereits ohne Markierung der Sarkomere im Differential-Interferenz-Kontrast zu sehen (nicht gezeigt).

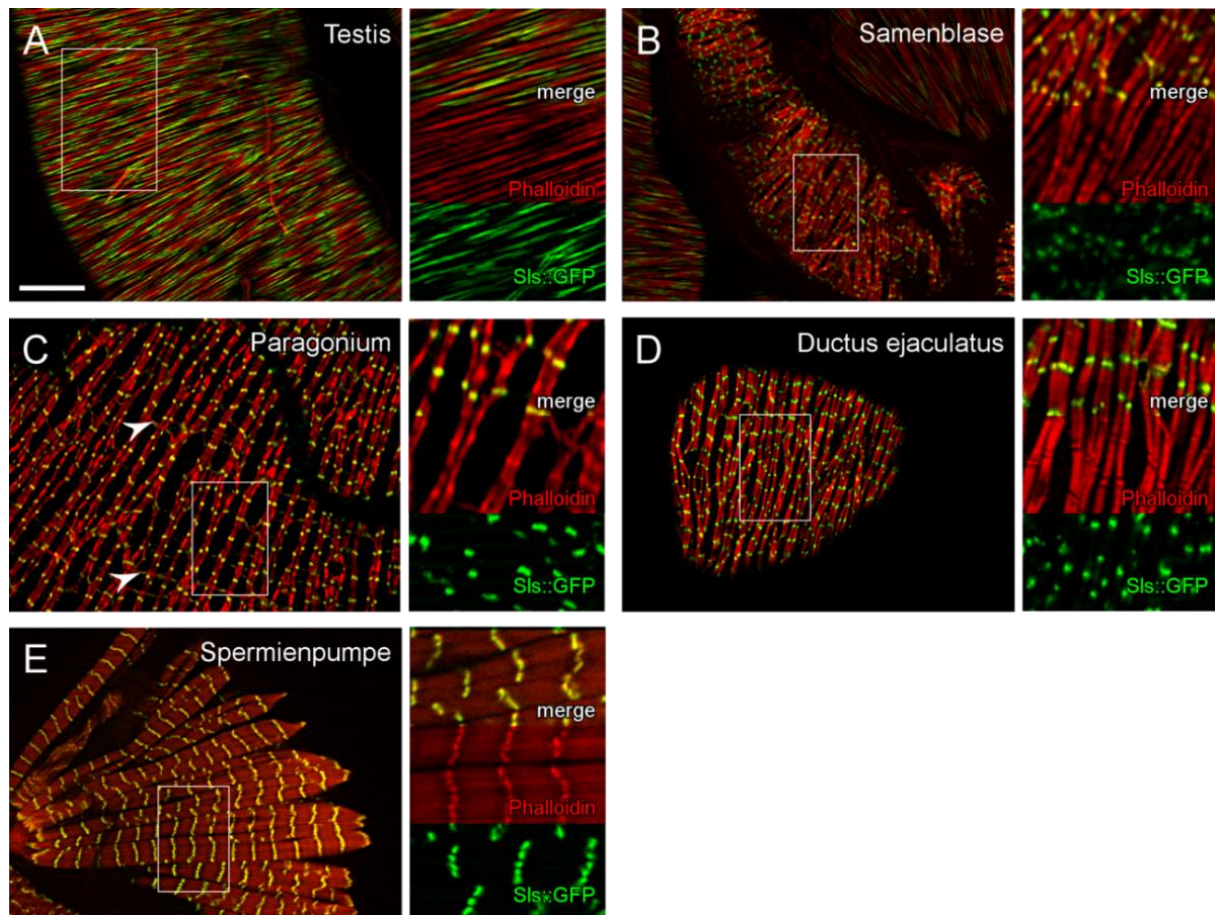


Abb. 12: Verteilung der Sarkomer-Komponenten Aktin und SIs in den Muskelschichten der inneren Organe des männlichen Reproduktionssystems

Nachweis von Aktin mittels Phalloidin an einer SIs::GFP Proteintrap-Linie in den Muskelschichten des Testis (A), der Samenblase (B), des Paragoniums (C) und des Ductus ejaculatus (D) sowie die Muskeln der Spermienpumpe (E). Die so dargestellte Testismuskulatur weist Ähnlichkeit mit glatten Muskeln auf, wobei die Muskulatur aller anderen Organe durch quergestreifte Muskeln aufgebaut zu sein scheint. Pfeilköpfe in C markieren Querverbindungen der Muskeln des Paragoniums. Eingerahmte Bereiche sind jeweils rechts neben dem Bild vergrößert dargestellt. Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μ m

Zusammenfassend zeigen sich durch die kombinierte Markierung der Sarkomer-Komponenten SIs und F-Aktin quergestreifte Muskelfasern um Samenblase, Paragonium, Ductus ejaculatus und Spermienpumpe. Die auf diese Weise dargestellte Muskelschicht um den Testis weist Ähnlichkeit zu glatter Muskulatur auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit einem Antikörpernachweis der Sarkomer-Komponente Tropomyosin erzielt werden (vergleiche Abb. 22).

5.2.2. Im männlichen Reproduktionssystem sind einkernige und mehrkernige Muskelfasern zu finden

In *Drosophila* sind sowohl einkernige Muskeln z.B. um die Ovarien (Hudson et al., 2008) als auch mehrkernige Muskeln z.B. an der larvale Körperwand zu finden (Bate, 1990). Deshalb

wurde die Muskulatur des männlichen Reproduktionstrakts hinsichtlich der Anzahl der Zellkerne untersucht.

Bei der Analyse verschiedener Fliegenlinien einer Proteintrap-Kollektion (zur Verfügung gestellt durch C. Klämbt, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) fiel die Linie L311 durch ein GFP-Expressionsmuster direkt außerhalb der Muskulatur auf (Kuckwa, 2010). Um festzustellen, in welchem Genlokus das P-Element in dieser Linie inserierte, wurde mit inverser PCR eine Vorhersage auf die Insertion im ‚*terribly reduced optic lobes*‘-Lokus (*trol*, auch als *perlecan* bezeichnet) getroffen (durchgeführt von U. Lammel, Westfälische Wilhelms-Universität Münster). *trol* kodiert für eine Komponente der extrazellulären Matrix. Der vorhergesagte Insertionsort wurde durch PCR an genomischer DNA mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden überprüft. Dafür wurden ein Primer 5‘ sowie ein Primer 3‘ des zu bestätigenden Ortes gewählt. Beide Primer zusammen ergaben kein PCR-Produkt, jedoch konnten jeweils mit einem Primer aus der Flanke des P-Elements und einem Gen-spezifischen Primer Produkte amplifiziert werden. Die Sequenzierung dieser Produkte konnte die Insertion im *trol*-Lokus bestätigen (siehe Anhang, Punkt 8.2.1).

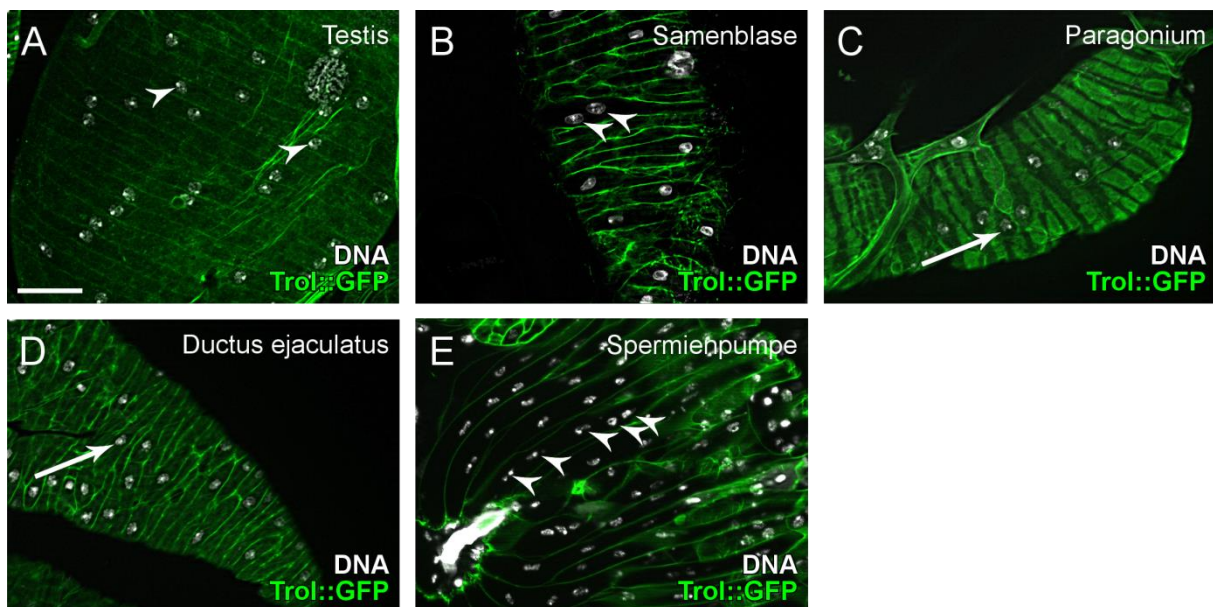


Abb. 13: Der männliche Reproduktionstrakt weist mehrkernige und einkernige Muskeln auf

Hoechst-Färbung an einer *Trol::GFP* exprimierenden Proteintrap-Linie. Dargestellt sind die Muskeln eines Testis (A), einer Samenblase (B), eines Paragoniums (C), eines Ductus ejaculatus (D) und einer Spermienspumpe (E). Das endogene GFP-Signal wurde zusätzlich mit einem GFP-spezifischen Antikörper verstärkt. Pfeilköpfe zeigen auf die Zellkerne der mehrkernigen Muskeln von Testis, Samenblase und Spermienspumpe. Pfeile markieren die Muskelzellkerne der einkernigen Muskeln von Paragonium und Ductus ejaculatus. Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 µm

Mittels der *Trol::GFP* Proteintrap-Linie L311 wurden die Begrenzungen der verschiedenen Muskeln dargestellt. Zur Verstärkung des Fluoreszenz-Signals wurde zusätzlich ein anti-GFP

Antikörper verwendet. Die DNA der Zellkerne wurde durch Hoechst-Farbstoff markiert (Abb. 13).

Im männlichen Reproduktionssystem konnten sowohl einkernige als auch mehrkernige Muskelfasern nachgewiesen werden: Die dünne Muskelhülle, die den Testis umgab, bestand aus mehrkernigen Muskeln (Abb. 13 A, Pfeilköpfe). Auch um die Samenblasen konnte in manchen Muskeln mehr als ein Kern gefunden werden (Abb. 13 B, Pfeilköpfe). Im Gegensatz dazu wurden keine Muskeln mit mehr als einem Kern in Paragonien oder im Ductus ejaculatus erfasst (Abb. 13 C und D, Pfeile). Die tubulären Muskeln der Spermienpumpe zeichneten sich ebenfalls durch Mehrkernigkeit aus (Abb. 13 E, Pfeilköpfe). Wie diese sehr unterschiedlich gestalteten Muskelschichten entstehen, insbesondere wie sie mehrkernig werden, war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.2.3. Testis-Myoblasten amplifizieren auf der Genitalscheibe und migrieren als mehrkernige Zellen auf den Testis

5.2.3.1. Die Menge der Myoblasten auf der Genitalscheibe nimmt im Verlauf der Metamorphose deutlich zu, bevor die Muskelvorläufer auf die Testes migrieren

Der männliche Reproduktionstrakt geht während der Metamorphose aus den Gonaden, die die Keimzellen enthalten, und der Genitalscheibe hervor (siehe Abb. 6). Die Genitalscheibe bildet dabei alle somatischen Teile, auch die gesamte Muskulatur (Bodenstein, 1950; Kozopas et al., 1998). Um die Entwicklung der Muskulatur zu verfolgen, wurde die Lokalisation der Myoblasten von Beginn der Metamorphose an beobachtet. Der Myoblasten-spezifische Transkriptionsfaktor DMef2 wird in allen Muskelzellen nach deren Spezifizierung exprimiert. Mit einem DMef2-Gal4 Treiber wurde nun ein UAS-GFP-Konstrukt exprimiert, das zusätzlich für das murine Oberflächenprotein CD8 kodiert, welches an der Zellmembran lokalisiert. Männliche Genitalscheiben mit den so markierten Myoblasten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung präpariert und direkt im Anschluss mikroskopisch analysiert (Abb. 14).

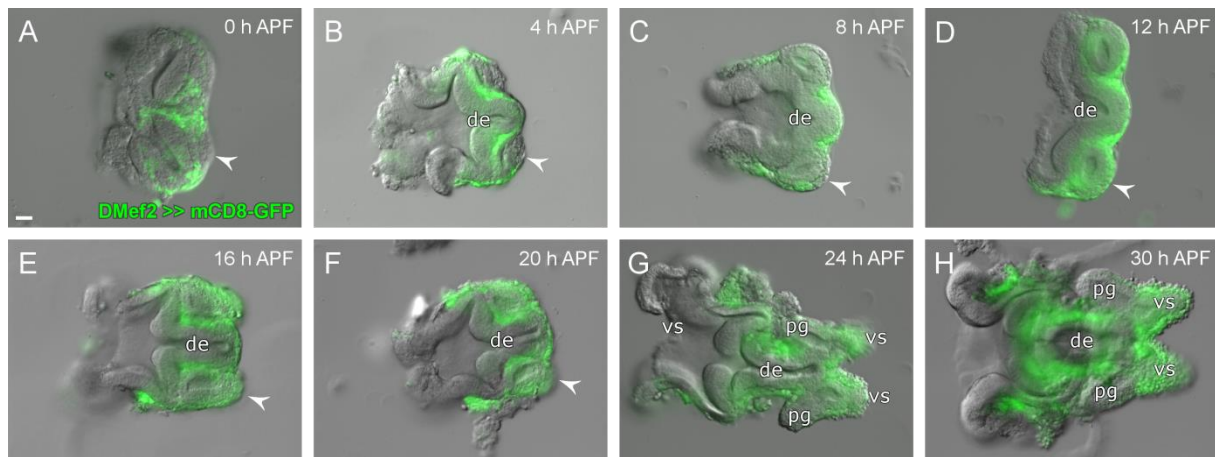


Abb. 14: Die Entwicklung der männlichen Genitalscheibe und ihrer Myoblasten 0 bis 30 h APF

Frisch präparierte männliche Genitalscheiben zu Beginn der Metamorphose (A), 4 h APF (B), 8 h APF (C), 12 h APF (D), 16 h APF (E), 20 h APF (F), 24 h APF (G) und 30 h APF (H). Myoblasten sind markiert durch DMef2-Gal4 getriebene UAS-mCD8-GFP Expression. Im Verlauf der Metamorphose nimmt die Anzahl an Myoblasten auf der Genitalscheibe stark zu. Pfeilköpfe: Samenblasen- und Paragonien-Vorläufer; vs: zukünftige Samenblase; pg: zukünftiges Paragonium; de: auswachsender Ductus ejaculatus. Maßstabsbalken: 20 μ m

Männliche Genitalscheiben, die zu Beginn der Metamorphose (0 h APF) präpariert wurden, zeigten einige wenige DMef2-positive Myoblasten (Abb. 14 A). Mit dem Voranschreiten der Metamorphose nimmt die Anzahl der Myoblasten zu (Abb. 14 C-H) und eine starke Umformung der Genitalscheibe findet statt. Die zukünftigen Samenblasen und Paragonien wachsen ab etwa 16 h APF aus anterior gelegenen Knospen aus (Pfeilköpfe in Abb. 14). Diese Knospen werden schon 4 h APF von adepthelialen Zellen besiedelt, die durch DMef2-Expression gekennzeichnet sind (Abb. 14 B). Ab etwa 24 h APF sind auswachsende Samenblasen und Paragonien klar voneinander unterscheidbar (Abb. 14 G). Zu diesem Zeitpunkt wurden auf der zukünftigen Samenblase eine Vielzahl adepthelialer, DMef2 positiver Myoblasten beobachtet, wobei die entstehenden Paragonien nur von einer dünnen Schicht aus Myoblasten bedeckt waren. Auch auf dem nun langsam auswachsenden Ductus ejaculatus waren ebenfalls Myoblasten zu finden (Abb. 14 G). Am posterioren Ende entsteht etwa 20 h APF der Enddarm, der ebenfalls von Muskeln umschlossen wird (nicht gezeigt).

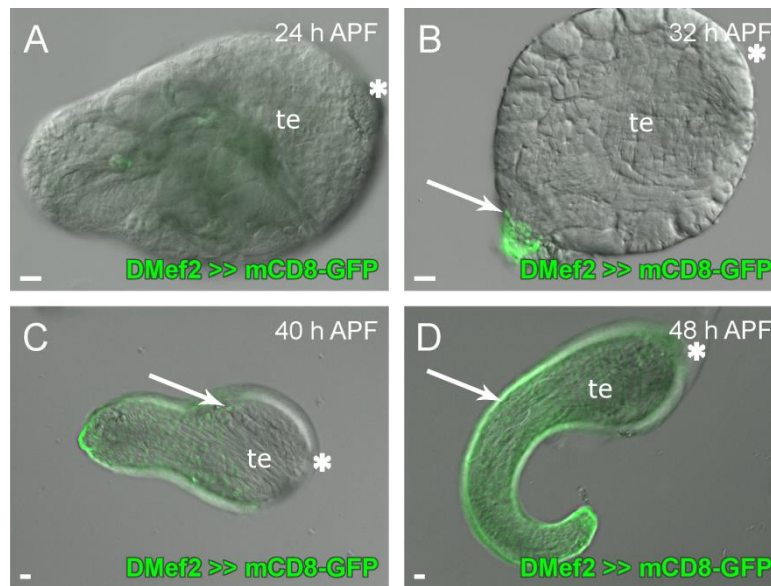


Abb. 15: Die Entwicklung des Testis und seiner Muskelvorläufer

Muskelvorläufer wurden auf den Testes durch DMef2-Gal4 getriebene UAS-mCD8-GFP Expression markiert. Ein frisch präparierter Testis 24 h APF wies keine Myoblasten auf (A). 32 h APF waren erste DMef2-positive Zellen sichtbar (B). 40 h APF beginnt der Testis mit den aufliegenden Muskelvorläufern auszuwachsen (C). 48 h APF hat die Spiralisierung des Testis begonnen, wobei die Myoblasten den Testis bereits weitgehend bedecken (D). te: Testis; Sternchen: Hubregion. Maßstabsbalken: 20 μ m

Etwa 30 h APF nehmen Genitalscheibe und Testes Kontakt auf (Bodenstein, 1950). Weiterhin wurde in vorangegangenen Studien beschrieben, dass erst nach der Kontaktaufnahme die Myoblasten auf die Testes wandern (Kozopas et al., 1998). In Übereinstimmung damit wurden hier ebenfalls bis 24 h APF keine Myoblasten mittels DMef2-getriebenen GFP-Reporters auf den Testes aufgefunden (Abb. 15 A). Im Gegensatz dazu besaßen 32 h APF präparierte Testes bereits DMef2-positive Zellen am proximalen Ende (Abb. 15 B, Pfeil). Im Anschluss an die Kontaktaufnahme von Genitalscheibe und Testes beginnen die Testes auszuwachsen. Einzeln präparierte Testes 40 h APF werden locker von den Myoblasten bedeckt, jedoch noch nicht vollständig von ihnen umschlossen (Abb. 15 C). Erst im weiteren Verlauf der Entwicklung strecken sich die Myoblasten, bis der Testis vollständig von ihnen eingehüllt ist (Abb. 15 D, Pfeil).

Durch die Markierung und Nachverfolgung der Myoblasten konnte gezeigt werden, dass bereits zu Beginn der Metamorphose einige Muskelvorläufer auf der Genitalscheibe vorhanden sind, die in ihrer Menge stark zunehmen, bevor einige von ihnen nach der Kontaktaufnahme der entstehenden Samenblasen mit den Testes auf diese migrieren. Wann und wie die Muskulatur des Testis mehrkernig wird, ist jedoch noch offen.

5.2.3.2. Die Myoblasten auf der frühen Genitalscheibe sind mitotisch aktiv

Durch die Beobachtung der Myoblasten auf der Genitalscheibe wurde festgestellt, dass ihre Anzahl im Verlauf der Metamorphose deutlich zunimmt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese Mengenzunahme auf mitotische Aktivität der Myoblasten zurückzuführen ist (Abb. 16).

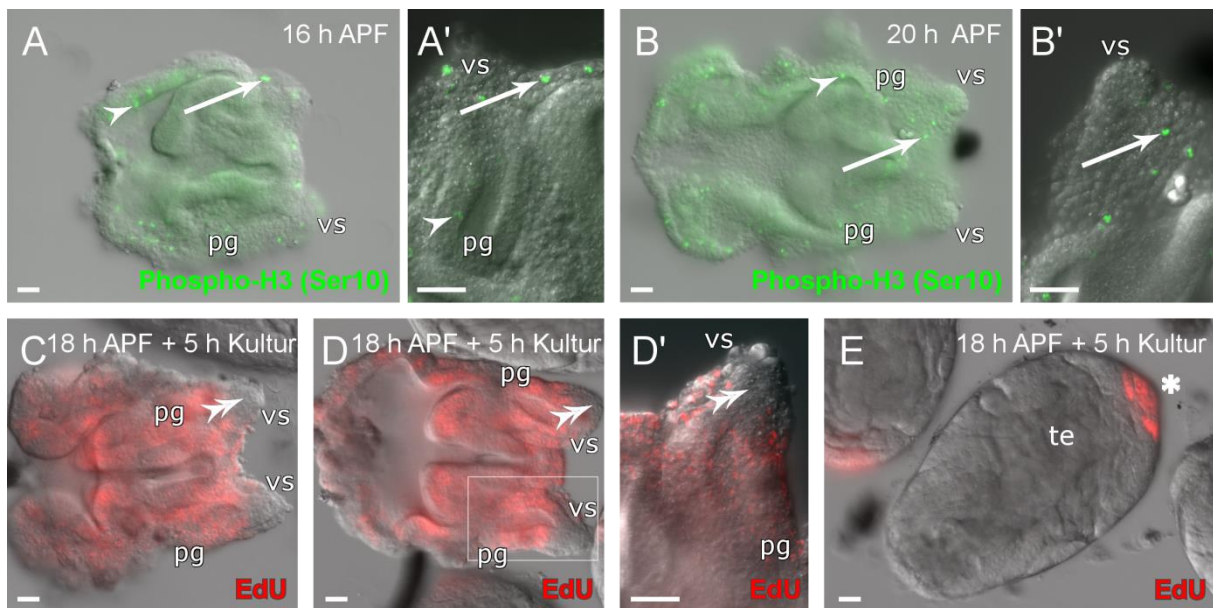


Abb. 16: Nachweis mitotischer Aktivität in der männlichen Genitalscheibe

Die Detektion der Signale eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Histon H3 an Serin 10 weist auf Mitosen in Genitalscheiben sowohl 16 h APF (A und A') als auch 20 h APF (B und B') in den adephelialen Myoblasten (Pfeile) und den Zellen des Epithels (Pfeilköpfe) hin. Ergänzend dazu konnte DNA-Replikation im Epithel und den Myoblasten nachgewiesen werden: nach Exposition von Genitalscheiben mit EdU für 5 h *ex vivo* konnten EdU-positive Zellkerne detektiert werden (C-D', eingerahmter Bereich in D ist in D' vergrößert dargestellt). Ein kleiner Bereich in den zukünftigen Samenblasen blieb frei von nachweisbarem EdU (Doppelpfeilköpfe). Zur Kontrolle dient ein simultan *ex vivo* kultivierter pupaler Testis, der EdU-positive Keimzellen aufweist (E). vs: Samenblase; pg: Paragonium; te: Testis; Sternchen: Hubregion. Maßstabsbalken: 20 µm

Die Kondensation von Chromosomen bei Mitosen wird unter anderem durch die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 begleitet. Diese Histon-Modifikation kann mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Ein Antikörper gegen Phospho-H3 (Ser10) detektierte in Genitalscheiben 16 h APF und 20 h APF klare Signale in einigen Zellkernen (Abb. 16 A-B'). Zu den Phospho-H3 (Ser10)-positiven Zellen gehören auch einige adepheliale Myoblasten auf Samenblasen, Paragonien und Ductus ejaculatus (Abb. 16 A-B', Pfeile). Außerdem zeigen Zellen der Epithelschicht ein Signal (Abb. 16 A-B, Pfeilköpfe).

Es ist möglich, verschiedene pupale *Drosophila* Gewebe, z.B. die Flügelscheiben (Aldaz et al., 2010) oder die Testes (Awe und Renkawitz-Pohl, 2010) zu explantieren und deren Weiterentwicklung in Kultur zu beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode

etabliert, bei der Genitalscheiben zusammen mit den dazu gehörenden Testes 18 h APF präpariert und in Kulturmedium inkubiert wurden (Details, siehe Material und Methoden, Punkt 4.3.8). Dem Kulturmedium wurde außerdem 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) beigesetzt. EdU ist ein Thymidin-Analogon, das bei der Replikation der DNA in diese eingebaut wird und durch kovalente Bindung an ein fluoreszierendes Azid nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise lassen sich erfolgte Replikationszyklen während der Exposition mit EdU beobachten (Abb. 16 C-D).

Nach 5 h in Kultur konnten morphologische Veränderungen der Genitalscheiben beobachtet werden (nicht gezeigt). Weiterhin konnte das Voranschreiten der Entwicklung *ex vivo* durch den Einbau von EdU in einigen Zellen des Genitalscheibenepithels und der Myoblastenschicht (Abb. 16 C-D'), aber auch in den Keimzellen der Testes (Abb. 16 E) nachgewiesen werden. Dabei fällt auf, dass in einem kleinen Bereich in den anterioren Spitzen der zukünftigen Samenblasen keine EdU-positiven Zellkerne zu finden sind (Abb. 16 C-D', Doppelpfeilköpfe). Der positive EdU-Nachweis zeigt, dass während der Kultivierung DNA-Replikation im Epithel und den Myoblasten stattfand.

Zusammengefasst lässt sich, durch die Hinweise auf DNA-Replikation und die Phosphorylierung von Histon H3, die Mengenzunahme der Myoblasten auf der männlichen Genitalscheibe durch Proliferation im Verlauf der Metamorphose erklären.

5.2.3.3. Alle auf den Testis migrierenden Muskelzellen sind bereits mehrkernig

Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Muskeln der Testes mehrkernig sind und im Verlauf ihrer Entwicklung von der Genitalscheibe auf die Testes migrieren. Im Folgenden wurden die Testismuskeln genauer analysiert, um festzustellen, wann die Mehrkernigkeit entsteht. Dafür wurden Muskelzellen durch DMef2 getriebenes mCD8-GFP markiert und die DNA der Zellkerne mittels Hoechst sichtbar gemacht. Zur Verstärkung des Fluoreszenz-Signals wurde zusätzlich ein anti-GFP Antikörper verwendet (Abb. 17).

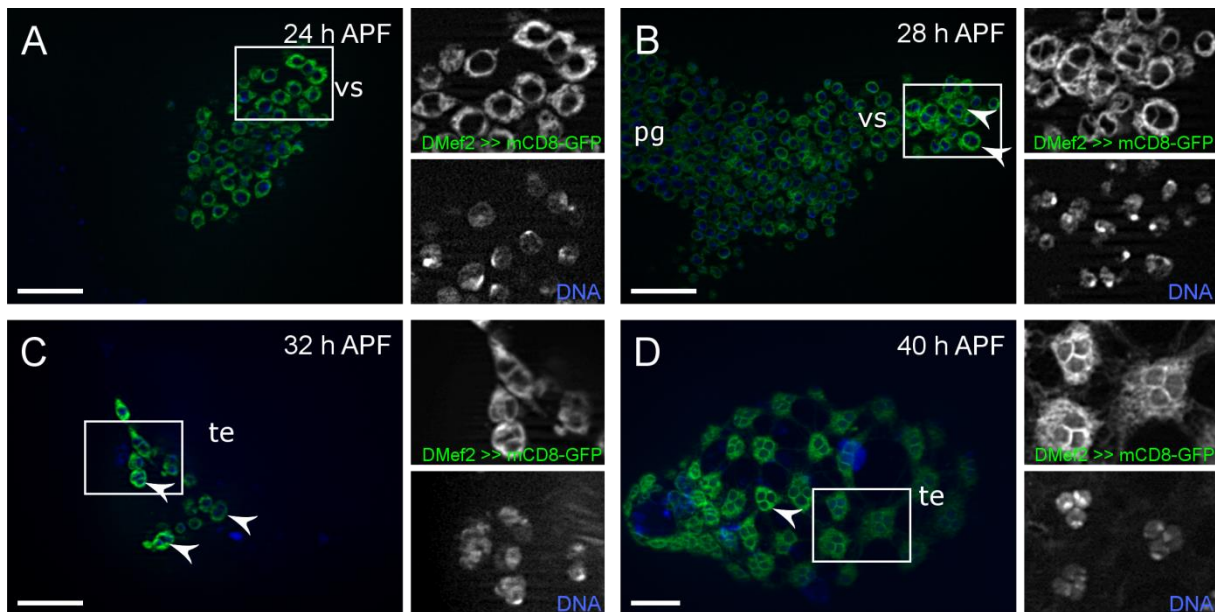


Abb. 17: Die auf den Testis wandernden Muskelvorläufer sind mehrkernig

Zellkerne von Myoblasten und naszierende Myotuben, gekennzeichnet durch DMef2-Gal4 getriebene UAS-mCD8-GFP Expression (grün), wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt (blau). Kästen markieren vergrößerte Bereiche, die zusätzlich in einzelnen Kanälen dargestellt sind. Auf entstehenden Samenbasen 24 h APF befinden sich nur einkernige Myoblasten (A), wobei 28 h APF an dieser Stelle mehrkernige DMef2-positive Zellen zu finden sind (B). Die Muskelvorläufer, die 32 h APF auf die Testes wandern, sind ebenfalls mehrkernig (C). Zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung sind auf Testes nur mehrkernige Myotuben erkennbar (D). Pfeilköpfe markieren mehrkernige Myoblasten. te: Testis; vs: zukünftige Samenblase; pg: zukünftiges Paragonium; alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μ m

Bis 24 h APF waren auf der Samenblase nur einkernige Myoblasten sichtbar (Abb. 17 A). Im Gegensatz dazu konnten ab 28 h APF an der anterioren Spitze der Samenblase einige mehrkernige DMef2-positive Zellen beobachtet werden (Abb. 17 B, Pfeilköpfe). Die Myoblasten auf den Paragonien hingegen verblieben einkernig (Abb. 17 B). Alle DMef2-positiven Zellen auf dem Testis wiesen 32 h APF, direkt nach der Migration von der Genitalscheibe, mehrere Zellkerne auf (Abb. 17 C, Pfeilköpfe). Dies ist besonders gut in späteren Stadien zu erkennen (Abb. 17 D, Pfeilköpfe), unfusionierte Myoblasten waren zu diesem Zeitpunkt nicht zu sehen.

Da in den gezeigten Ergebnissen einkernige Myoblasten nur auf der Genitalscheibe nachgewiesen werden können, wird vermutet, dass alle entstehenden Testismuskeln bereits mehrkernig als naszierende Myotuben auf dem Testis ankommen, wobei die Testis-Myoblasten auf der Genitalscheibe bereits 28 h APF mehrkernig werden.

5.2.3.4. Die Muskulatur des Testis wird durch Myoblastenfusion mehrkernig

Soweit bisher bekannt, entstehen alle mehrkernigen Muskeln in *Drosophila* durch die Fusion von Myoblasten (beispielsweise zusammengefasst in: Schulman et al., 2015). Der andere Mechanismus, der zu mehrkernigen Zellen führen kann, ist der Ausfall der Zytokinese nach erfolgter Mitose, also Kernteilung ohne Teilung der Zelle. Dieser Prozess findet zum Beispiel während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* statt (Foe et al., 1993). In Säugetieren entstehen mehrkernige Leberzellen und Herzmuskelzellen ebenfalls durch Ausfall der Zytokinese (Gentric und Desdouets, 2014; Li et al., 1996; Liu et al., 2010). Aber auch die Entstehung von Tumoren oder krankhafte Veränderungen der glatten vaskulären Muskulatur werden von diesem Prozess begleitet (Lacroix und Maddox, 2012). Um festzustellen, welcher dieser beiden Mechanismen bei der Entstehung der glatten Testismuskulatur stattfindet, wurde untersucht, ob die Mehrkernigkeit durch Zellkern-Teilungen hervorgerufen wird. Dafür wurde die Replikation der DNA während der Entstehung der mehrkernigen Myotuben mittels EdU *in vivo* nachgewiesen (Abb. 18).

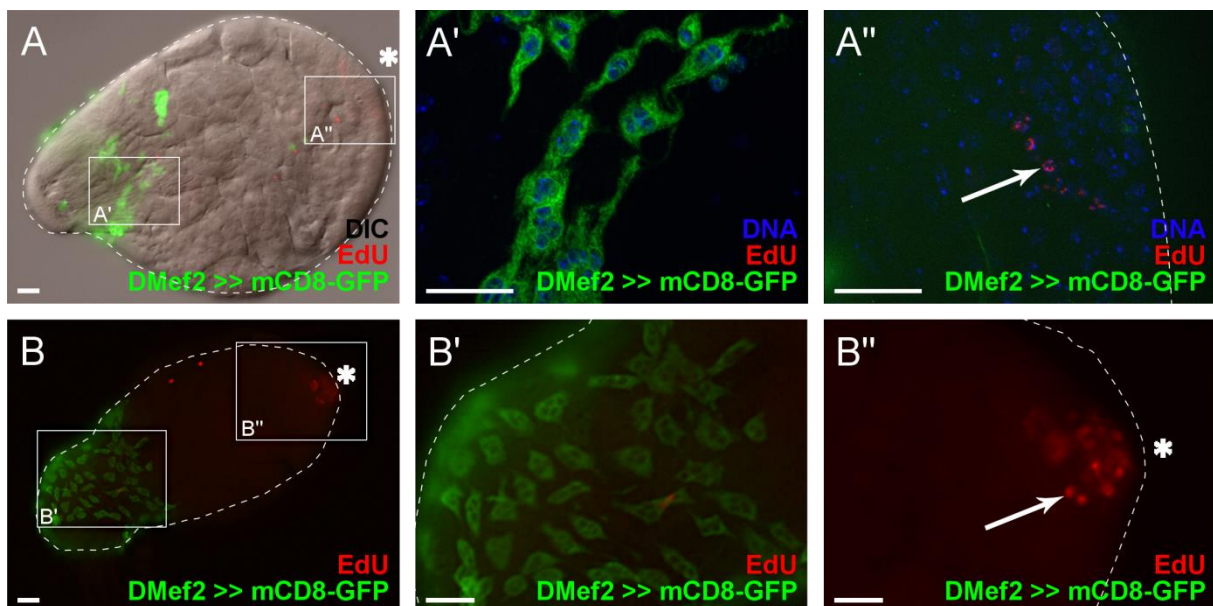


Abb. 18: Testismuskeln werden nicht replikationsabhängig mehrkernig

Testes nach Injektion von EdU in Puppen 24 h APF und anschließender Inkubation für 8 h (A) bzw. Injektion in Puppen 28 h APF und Inkubation für 7 h (B). Myoblasten waren dabei markiert durch DMef2-Gal4 getriebene UAS-mCD8-GFP Expression, Zellkerne in A wurden mit Hoechst gefärbt. In den Keimzellen fand während der Inkubationszeit DNA-Replikation statt (A'' und B'', Pfeile), wobei die Muskelzellen keine Anzeichen von Kernteilungen innerhalb der Inkubationszeit zeigten (A' und B'). Sternchen: Hubregion; A' und A'' sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 μ m

EdU wurde in Puppen 24 h und 28 h APF injiziert, die mCD8-GFP im DMef2-Muster exprimierten. Nach Inkubation für 7-8 h bei 24 °C wurden die Testes dieser Puppen

präpariert, fixiert und analysiert. Während der Inkubationszeit wurden die Testis-Myoblasten mehrkernig und sind auf den Testis gewandert (Abb. 18 A und B). Die Zellkerne der naszierenden Myotuben auf dem Testis zeigten kein EdU-Signal (Abb. 18 A' und B'). Während der Inkubationszeit hat demnach keine DNA-Replikation in den DMef2-positiven Zellen stattgefunden. Gleichzeitig konnte ein EdU-Einbau in den mitotisch aktiven Keimzellen in der Nähe des Testis-Hubs detektiert werden (Abb. 18 A'' und B'', Pfeile). Diese EdU-positiven Keimzellen demonstrieren sowohl den erfolgreichen Einbau und die Detektion von EdU als auch die voranschreitende Entwicklung des Testis nach der Injektion.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrkernigkeit der Testismuskeln unabhängig von DNA-Replikation entsteht. Deshalb wird angenommen, dass der Ausfall der Zytokinese bei der Entwicklung der Testismuskulatur nicht stattfindet. Weiterhin kann aus diesen Daten auf einen Zellfusionsmechanismus zur Bildung der mehrkernigen Testismuskeln geschlossen werden.

5.2.4. Vor dem Auftreten der Myoblastenfusion werden Anhäufungen von Aktin beobachtet

Mit den vorangegangenen Analysen konnte gezeigt werden, dass Myoblasten auf der Genitalscheibe nach einer Proliferationsphase fusionieren, um die Testismuskulatur zu bilden. Der Fusionsmechanismus selbst bleibt jedoch offen. Im Folgenden wurde der Fusionsprozess zur Bildung der Testismuskeln auf Ähnlichkeiten zur embryonalen Myogenese hin genauer untersucht.

Ein zentraler Faktor bei der Fusion von Myoblasten im Embryo ist die Umstrukturierung von F-Aktin. Bevor die FCMs mit den wachsenden Myotuben verschmelzen, wird die transiente Bildung eines Fokus aus verzweigtem F-Aktin an der Kontaktstelle der Zellen beobachtet. Mit Hilfe des Aktin-bindenden Peptids Lifeact (Riedl et al., 2008) wurde *ex vivo* untersucht, ob im Verlauf der Entwicklung ebenfalls ein Aktin-Fokus bei der Fusion der Myoblasten auf der Genitalscheibe entsteht. Dafür wurde GFP-gekoppeltes Lifeact im DMef2-Muster exprimiert. Um die einzelnen Myoblasten anhand ihrer Zellkerne leichter zu unterscheiden, wurde zusätzlich rot fluoreszierendes mCherry mit Kernlokalisierungs-Signal („nuclear localization signal“, NLS) exprimiert (Abb. 19).

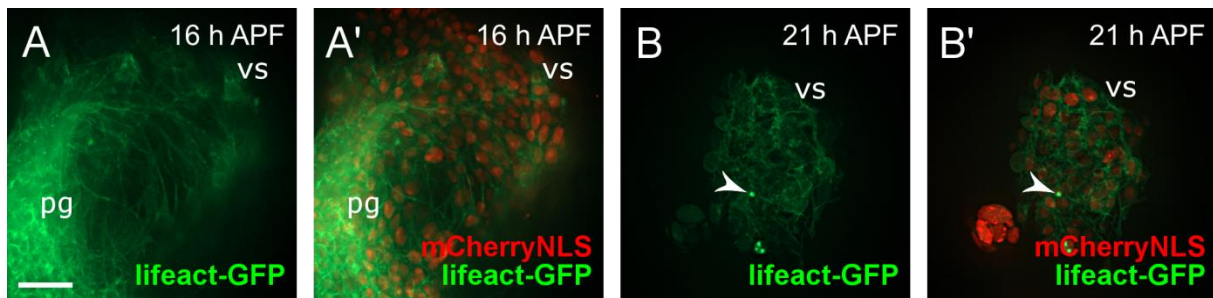


Abb. 19: Aktin-Akkumulationen können sehr selten in den Myoblasten auf der Genitalscheibe beobachtet werden

Lifeact-GFP und Kern-lokalisierendes mCherry wurde im DMef2-Muster exprimiert und frisch analysiert. Die auswachsenden Samenblasen 16 h APF zeigen eine gleichmäßige Verteilung von Aktin an der Zellmembran (A, A'). 21 h APF kann vereinzelt eine Anhäufung von Aktin an der Membran beobachtet werden (Pfeilkopf, B, B'). Dargestellt sind Z-Projektionen von konfokalen Schnitten; vs: Samenblase; pg: Paragonium. Maßstabsbalken: 20 μ m

16 h APF präparierte männliche Genitalscheiben zeigten eine schwache Lifeact-GFP-Expression, die hauptsächlich an der Zellmembran der Myoblasten lokalisierte (Abb. 19 A). Die Verteilung war gleichmäßig, einzelne Akkumulationen fielen dabei nicht auf. Weiterhin wurde deutlich, dass die Myoblasten auf den zukünftigen Samenblasen und Paragonien sehr dicht übereinanderliegen und insbesondere an der Spitze der Samenblase mehrere adeptheliale Zellschichten bilden (Abb. 19 A'). Die Anordnung der Zellen macht die Auswertung der Bilder schwierig, da einzelne Myoblasten optisch kaum voneinander unterschieden werden können. Auch 21 h APF lagen die Myoblasten sehr eng aneinander und übereinander (Abb. 19 B und B'), sodass eine genaue Identifizierung einzelner Myoblasten schwierig war. Dennoch konnten vereinzelt Anreicherungen von Lifeact-GFP im Bereich der anterioren Spitze der zukünftigen Samenblase beobachtet werden (Abb. 19 B und B', Pfeilköpfe). Ob die beobachteten Strukturen vergleichbar mit dem transienten Auftreten des Aktin-Fokus im Embryo sind, bleibt unklar. Jedoch sind die hier beobachteten Aktin-Akkumulationen ein Hinweis auf Aktin-Reorganisation während der Entwicklung der Testismuskulatur und weist auf mögliche Ähnlichkeiten zur embryonalen Myoblastenfusion hin.

5.2.5. RNA lässt sich spezifisch aus Genitalscheiben-Myoblasten isolieren

Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Myoblasten, die die mehrkernige Testismuskulatur bilden, auf der männlichen Genitalscheibe fusionieren. Um die molekularen Komponenten der Myoblastenfusion auf der Genitalscheibe in großem Maßstab zu analysieren, sollten Transkriptom-Analysen der Myoblasten durchgeführt werden. Um die Transkripte der Myoblasten zu analysieren, wurde eine Methode zur spezifischen Isolation von Myoblasten-RNA etabliert. Genitalscheiben von DMef2-getriebenen mCD8-GFP-positiven Puppen

wurden hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung präpariert und mittels Elastase zu einzelnen Zellen dissoziiert. Die Myoblasten wurden im Anschluss mit anti-mCD8-gekoppelten magnetischen Kügelchen herausgesammelt und die RNA isoliert (Abb. 20 A, für Details siehe Material und Methoden, Punkt 4.2.10). Die Reinheit der isolierten Myoblasten konnte mikroskopisch bestätigt werden (Abb. 20 B). Mit der auf diese Weise gewonnenen Myoblasten-RNA können zwar mit reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) Transkripte für Myogenese-Komponenten, Determinationsfaktoren und Signalwegs-Komponenten nachgewiesen werden (Fender, 2016; Fritzen, 2017), die Quantität und Qualität der RNA war jedoch nicht ausreichend, um Hochdurchsatz-Screenings wie RNA-Seq oder Microarrays durchzuführen. Möglicherweise ist dies zurückzuführen auf eine nicht ausreichend starke Expression von mCD8-GFP an der Zelloberfläche, um Myoblasten in großer Menge zu isolieren. Die Nutzung alternativer Konstrukte mit anderen Membran-integrierenden Proteinen könnte für einen höheren Isolationserfolg sorgen.



Abb. 20: Isolation Myoblasten-spezifischer RNA

RNA kann spezifisch aus den Myoblasten von Genitalscheiben mit der im Fließbild dargestellten Methode isoliert werden (A). Vor Isolation der RNA lässt sich die Reinheit der isolierten Myoblasten mikroskopisch überprüfen: nur GFP-positive Zellen (Pfeilkopf) haften an den magnetischen Kugeln (B). Maßstabsbalken: 20 µm

5.2.6. Adhäsionsmoleküle der embryonalen Myogenese werden bei der Entstehung der Testismuskulatur exprimiert und sind funktionell relevant

5.2.6.1. Die Adhäsionsmoleküle *duf* und *sns* werden während der Entwicklung der Testismuskulatur transkribiert

Die Myoblastenfusion im Embryo wird durch die Adhäsion zweier Zellen initiiert. Hierfür essentiell sind die IgSF-Moleküle Duf und Rst auf der Seite der FC/wachsenden Myotube bzw. Sns und Hbs in den FCMs. Im Folgenden wurde untersucht, ob diese Adhäsionsmoleküle auch an der Entstehung der männlichen Genitaltrakt-Muskulatur beteiligt sind. Dafür wurden transgene Fliegen mit den Promotor-Konstrukten rp298-Gal4 und *sns*-mCherry mit

NLS genutzt. Die Treiberlinie *rp298-Gal4* ist aus einem Enhancer-Trap im *duf*-Lokus hervorgegangen (Menon und Chia, 2001; Nose et al., 1998) und wurde hier in Kombination mit UAS-GFP oder UAS-GFP mit NLS genutzt, um das Expressionsmuster sichtbar zu machen. Der *sns-mCherry-NLS* Reporter wurde durch den Austausch der *lacZ*-Region aus einem *sns-lacZ* Konstrukt hergestellt (Haralalka et al., 2011; Kocherlakota et al., 2008). Die genutzten Fliegenlinien wurden in vorangegangenen Arbeiten etabliert und im Embryo in ihrer Funktion bestätigt. Genitalscheiben dieser Fliegen wurden nun im Hinblick auf die Expressionsmuster von *rp298-Gal4* getriebenem GFP und *sns-mCherry* hin untersucht, um festzustellen, ob die Zelladhäsionsmoleküle exprimiert sind und wie sich die räumliche Verteilung auf der Genitalscheibe gestaltet (Abb. 21).

Sowohl *rp298-Gal4* als auch *sns-mCherryNLS* sind in der männlichen Genitalscheibe exprimiert. *rp298*-getriebene GFP-Expression konnte 16 h APF in verschiedenen Bereichen der Genitalscheibe vorgefunden werden (Abb. 21 A). Dazu zählen auch die auswachsenden Samenblasen und Paragonien (Abb. 21 A'). 24 h APF waren deutliche GFP-Signale in den adäpithelialen Zellen der Samenblasen sichtbar (Abb. 21 B und B', Pfeilköpfe). *rp298*-Expression konnte außerdem in Epithelzellen der Paragonien beobachten werden (Abb. 21 B', Pfeil). Es handelt sich hierbei um die sekretorischen „secondary cells“ (Susic-Jung et al., 2012). *sns-mCherryNLS* zeigte ein ähnliches Muster. Einige Zellen des Epithels, insbesondere im posterioren Bereich, zeigten ein deutliches Signal 16 h APF und 24 h APF (Abb. 21 C und D). Außerdem war, wenn auch schwach, ein mCherry-Signal in den Myoblasten 24 h APF sichtbar (Abb. 21 D', Pfeilkopf).

In der somatischen Muskulatur des Embryos fusionieren zwei heterotypische Zellpopulationen: FCMs sind positiv für *Sns*, wobei FCs *Duf* exprimiert. Bei einer gleichzeitigen Beobachtung von *rp298*-getriebenem GFP mit NLS und *sns-mCherry-NLS* in männlichen Genitalscheiben ließen sich auf der zukünftigen Samenblase Zellen identifizieren, die nur das GFP-Signal zeigten (Abb. 21 E-E'', Pfeilkopf). Zusätzlich dazu waren auch Myoblasten erkennbar, die sowohl positiv für GFP-Expression als auch für mCherryNLS schienen (Abb. 21 E-E'', Pfeil).

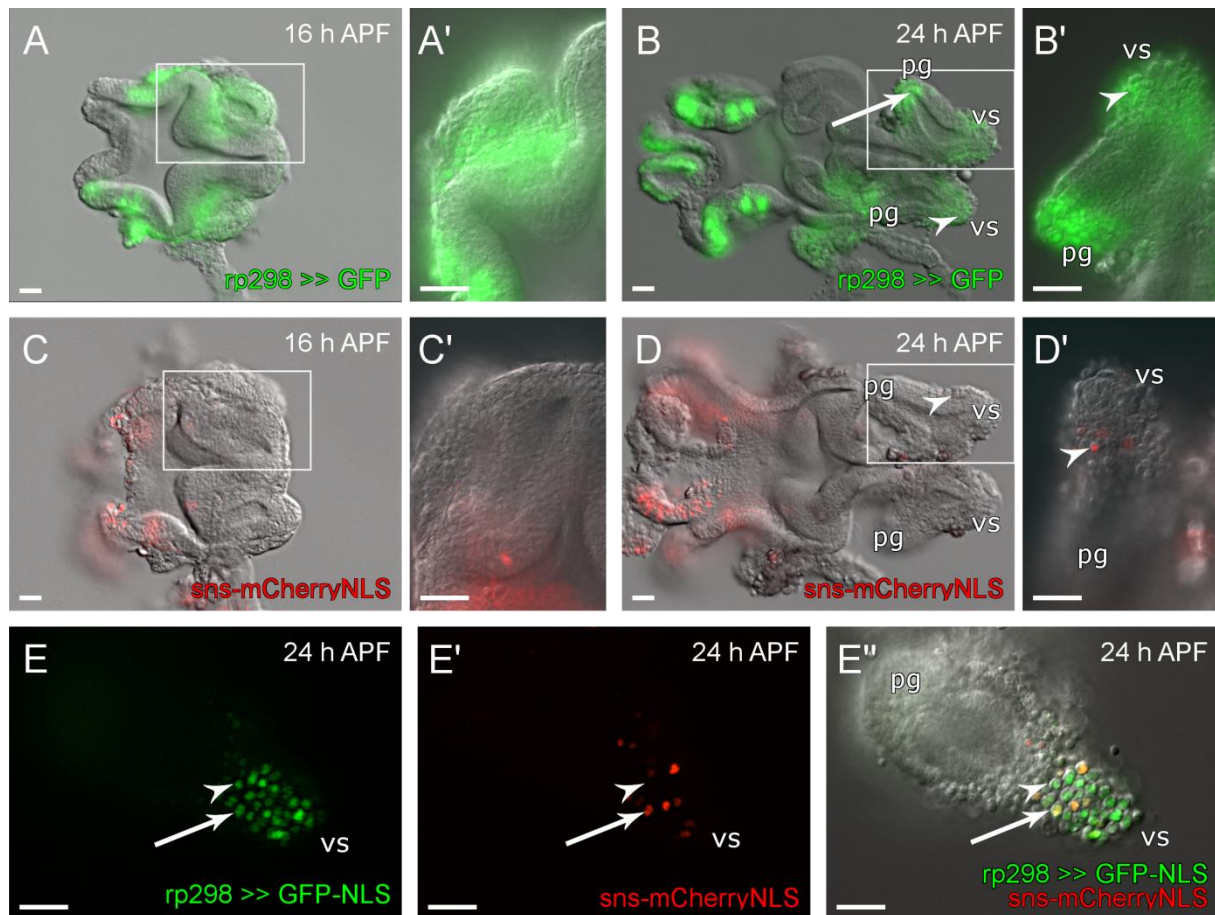


Abb. 21: Expression von *duf*- und *sns*- Promotor-Reporter-Konstrukten auf der männlichen Genitalscheibe

In männlichen Genitalscheiben kann *rp298*-getriebene GFP-Expression 16 h APF (A, A') und 24 h APF (B, B') im Bereich der entstehenden Samenblasen und Paragonien erkannt werden. *sns*-mCherryNLS ist 16 h APF (C-C') und 24 h APF (D, D') in den posterioren Bereichen von Genitalscheiben und in adephthelialen Zellen der zukünftigen Samenblasen detektierbar. Der optische Schnitt durch die zukünftige Samenblase und das Paragonium einer Genitalscheibe 24 h APF zeigt sowohl Zellen, die nur positiv für *Duf* sind (Pfeilkopf) als auch Zellen, die die Expression von *Duf* und *Sns* aufweisen (E-E'', Pfeil). vs: Samenblase; pg: Paragonium. Maßstabsbalken: 20 μ m

Diese Daten weisen darauf hin, dass *Duf* und *Sns* im Verlauf der Entstehung der Reproduktionstrakt-Muskulatur in den Myoblasten exprimiert werden. Zwar kann aus dem Expressionsmuster der Promotor-Konstrukte nicht auf die subzelluläre Lokalisation der Proteine geschlossen werden, doch gibt die räumliche Verteilung der *Duf*- und *Sns*-positiven Zellen einen Hinweis darauf, dass die Testis-Myoblasten eine heterogene Population bilden und, ähnlich wie die FCs und FCMs des Embryos, verschiedene Charakteristika aufweisen können. Die Expressionsmuster von *rp298*-Gal4 und *sns*-mCherryNLS deuten des Weiteren darauf hin, dass sich die Anordnung und Eigenschaften der Myoblasten auf der männlichen Genitalscheibe von dem im Embryo unterscheiden könnten. Aus diesem Grund unterscheidet sich hier möglicherweise auch die Funktionsweise der Adhäsionsmoleküle.

5.2.6.2. RNAi-vermittelter Knock-down einiger Zelladhäsionsmoleküle führt zu Defekten in der Testismuskelhülle

Durch das Expressionsmuster von Promotor-Reporter-Konstrukten wurde vermutet, dass Ig-Domänen Adhäsionsmoleküle, die relevant für die embryonale Myogenese sind, auch während der Entstehung des männlichen Reproduktionstrakts exprimiert werden (siehe Absatz 5.2.6.1). Allerdings wurde bisher nicht geklärt, welche Funktion die Adhäsionsmoleküle in diesem Kontext erfüllen. Um zu untersuchen, ob eine Relevanz für die Myoblastenfusion der Testismuskeln besteht, wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) versucht, die Transkript- und Proteinmenge der IgSFs zu reduzieren. Mittels UAS/Gal4-System wurden Sequenz-spezifische „RNAi-Hairpin“-Konstrukte während der Entstehung der Testismuskulatur spezifisch in der Myogenese transkribiert.

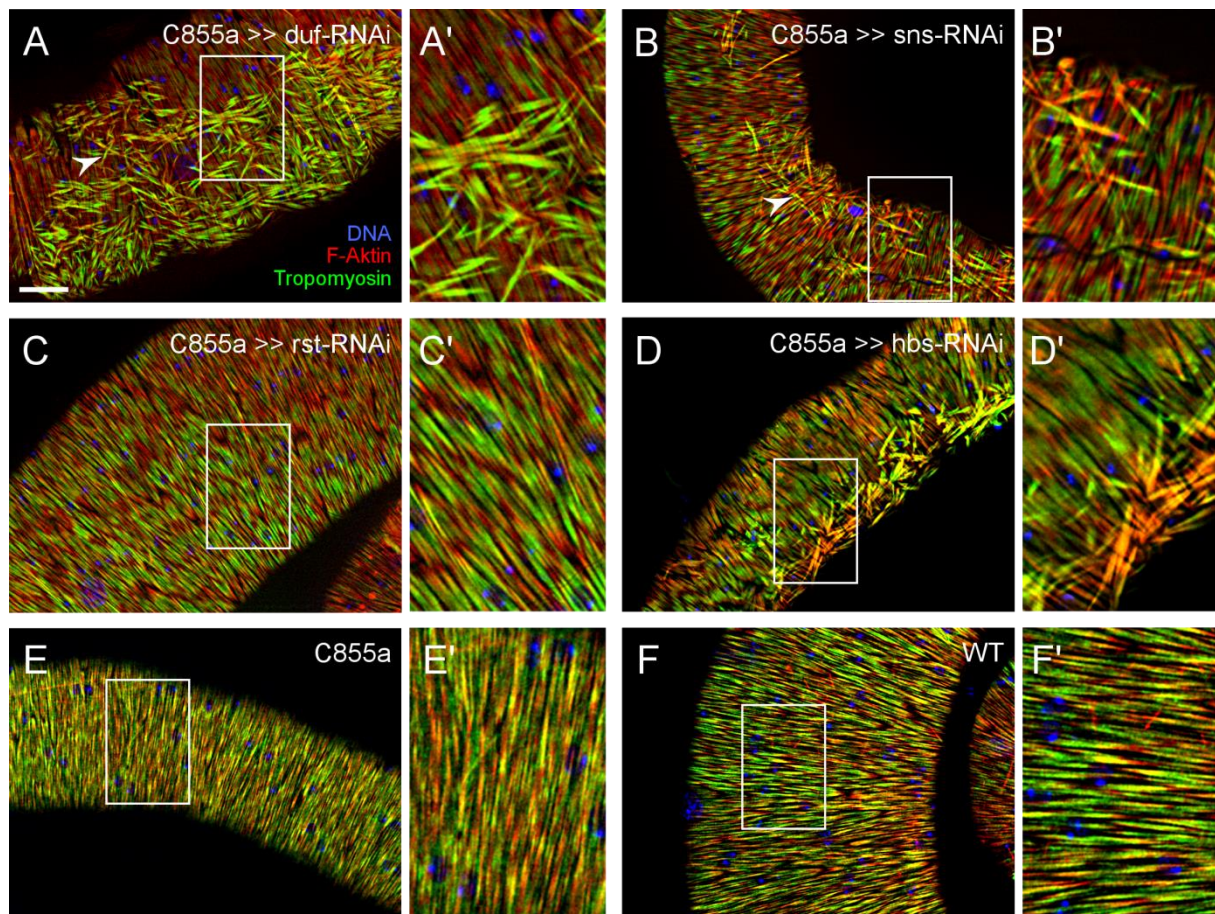


Abb. 22: Spezifischer Knock-Down der IgSF Adhäsionsmoleküle *duf*, *sns* und *hbs* kann zu fehlorganisierten Filamenten in den Testismuskeln führen

Adhäsionsmoleküle wurden durch RNAi-vermittelten Knock-down mit C855a-Gal4 in der Testismuskel-Entwicklung herunterreguliert. Die Filamente wurden mit Phalloidin (rot) und anti-Tropomyosin Antikörper (grün) sichtbar gemacht, DNA wurde mittels Hoechst angefärbt (blau). Der Knock-down von *duf* (A), *sns* (B) und *hbs* (D) führt zu verstreuten Filamenten (Pfeilköpfe) über der regulären Muskelschicht. Die entstandene Testismuskulatur nach *rst*-RNAi (C) zeigte genauso wie die Treiber-Linie allein (E) ein wildtypisches Muskelmuster (F). Alle Bilder sind optische Schnitte. Maßstabsbalken: 20 µm

Mit der AMP-spezifischen Treiberlinie 1151-Gal4 (verwendet z.B. in: Bryantsev et al., 2012; Gildor et al., 2012; Soler et al., 2004) konnte keine GFP-Expression in der Reproduktions-trakt-Muskulatur hervorgerufen sowie in RNAi-Versuchen keine Defekte erzeugt werden (nicht gezeigt). Daraufhin wurden RNAi-Konstrukte mit C855a-Gal4, einer nicht molekular charakterisierten Treiberlinie mit beschriebener Expression in der Testismuskelhülle aber ohne Expression in der embryonalen Myogenese (Hrdlicka et al., 2002), getrieben (Details zum Expressionsmuster des Treibers siehe Anhang, Punkt 8.7). Die resultierenden adulten Testismuskeln wurden im Hinblick auf ihr Filamentmuster analysiert. F-Aktin wurde dafür durch Phalloidin markiert und ein Antikörper gegen die Sarkomer-Komponente Tropomyosin verwendet, um Defekte in der Entwicklung aufzudecken (Abb. 22).

Die RNAi-vermittelte Reduktion von *duf*, *sns* und *hbs* mittels C855a-Gal4 führte zu verstreuten Filamenten, die der regulären Testis-Muskelhülle bündelweise auflagen (Abb. 22 A, B und D, Pfeilköpfe). Dieser Defekt wurde als Mikado-Phänotyp benannt. Die Testismuskeln waren weiterhin mehrkernig und es konnten keine Defekte in der Ausbildung der Reproduktionsorgane oder Infertilität beobachtet werden (nicht gezeigt). RNAi gegen *rst* hingegen zeigte genauso wie C855a-Gal4 oder die ungetriebenen RNAi-Linien ein wildtypisches Muskelmuster (Abb. 22 C, E und F, Daten nicht gezeigt).

Die auftretenden Störungen des Muskelmusters demonstrieren, dass RNAi-vermittelte Herunterregulation in der Testismuskulatur grundsätzlich möglich ist und für phänotypische Veränderungen sorgen kann, die leicht erkennbar sind. Des Weiteren geben diese Daten erste Hinweise darauf, dass Adhäsionsmoleküle für die korrekte Bildung der Testismuskulatur notwendig sind. Die Fliegenlinie C855a-Gal4 ist nicht molekular charakterisiert. Ein mit dieser Linie getriebenes GFP zeigt zwar Expression in adulter Reproduktionstrakt-Muskulatur, jedoch konnte kein Signal in Myoblasten auf der Imaginalscheibe beobachtet werden (Anhang, Punkt 8.7). Aus diesem Grund wird für weitere Knock-down Versuche ein anderer Gal-4 Treiber gewählt, um den Einfluss der Adhäsionsmoleküle auf die Entstehung der Testismuskulatur genauer zu analysieren.

5.2.6.3. Die Verminderung des Duf- und/oder Rst-Levels in Myoblasten führt zu einer geringeren Kernzahl in Testismuskeln

Die zuvor bereits verwendeten *duf*- und *rst*-RNAi Konstrukte wurden nun mittels DMef2-Gal4 exprimiert, um den Knock-down in den Testis-Myoblasten bereits vor der Zellfusion während der Metamorphose zu erzeugen. DMef2-Gal4 ist bereits 0 h APF auf der Genital-

scheibe stark exprimiert (siehe Absatz 5.2.3.1) und wurde in anderen Studien erfolgreich für RNAi-Versuche eingesetzt (Gildor et al., 2012). Da *Duf* und *Rst* beispielsweise in der embryonalen Myoblastenfusion redundant wirken (Strükelberg et al., 2001), wurde zusätzlich ein *duf*-RNAi+*rst*-RNAi Doppel-Knock-down durchgeführt. Da in einigen Fällen durch die Endoribonuklease Dicer 2 (*Dcr2*) eine zusätzlichen Verstärkung des RNAi-Effekts erzielt werden konnte, wurde *Dcr2* vergleichend koexprimiert (Dietzl et al., 2007).

Um festzustellen, ob durch den RNAi-vermittelten Knock-down von *duf* und/oder *rst* mittels *DMef2* ein Einfluss auf die Fusionseffizienz der Testis-Myoblasten besteht, wurde die Anzahl der Zellkerne der Testismuskeln von Knock-down Fliegen mit denen des Wildtyps verglichen. Da die Muskelhülle den adulten Testis lückenlos umschließt, sind einzelne Myotuben und ihre genaue Kernzahl nur sehr schwer zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden Testes aus Puppen ca. 42 h APF präpariert und nach Markierung der Muskulatur mit Hilfe eines anti-Tropomyosin Antikörpers und Hoechst-Färbung analysiert. Die naszierenden Myotuben pupaler Testes sind noch nicht auf ihre vollständige Länge elongiert, der Fusionsprozess ist jedoch bereits abgeschlossen (siehe Abb. 17). Die einzelnen Myotuben sind 42 h APF klar erkennbar, daher kann die Kernzahl leicht festgestellt werden.

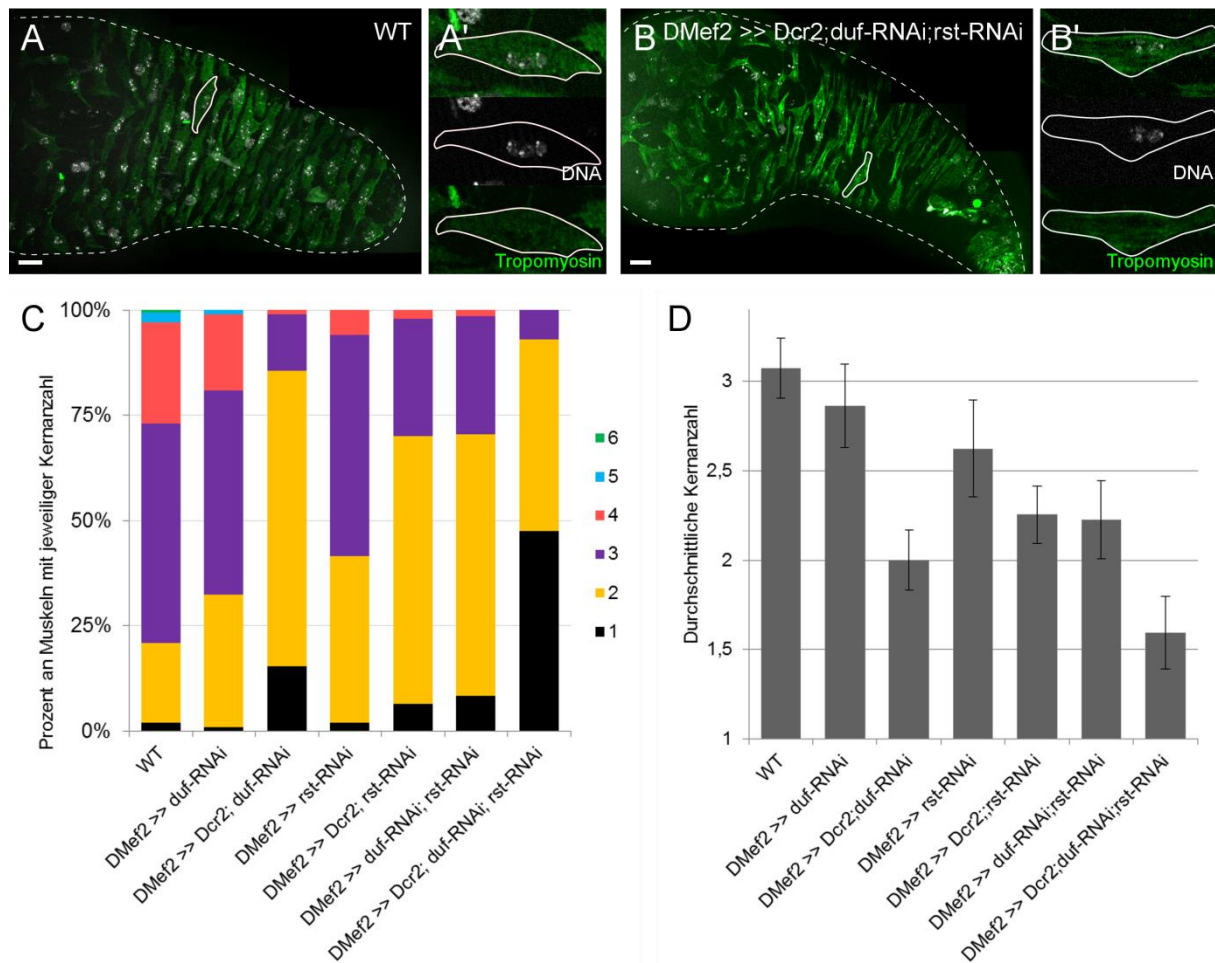


Abb. 23: Knock-down von *duf*, *rst* und *duf+rst* mittels DMef2-Gal4 führt zu verminderter Zellkernzahl in Testismuskeln

Zur Bestimmung der Anzahl von Muskelkernen wurden Testes der verschiedenen Genotypen 42 h APF präpariert, fixiert und mit einem Anti-Tropomyosin Antikörper zum Nachweis der Muskulatur (grün) sowie Hoechst zur Markierung der Zellkerne (weiß) inkubiert. Die wildtypischen Testes (A, A') unterscheiden sich in ihrer Morphologie nicht von den *duf+rst* Knock-down-Testes (B, B'). Im Anschluss wurde die Anzahl der Zellkerne in Testismuskeln nach Knock-down von *duf*-, *rst*- oder *duf+rst* mittels RNAi in 20 Muskeln von jeweils 10 Testes verglichen. Die graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 1 zeigt, dass der Knock-down in allen Fällen zu einer geringeren Kernanzahl führt: sowohl die Anzahl der Zellkerne pro Muskel (C), als auch die durchschnittliche Kernanzahl (D) ist reduziert. Maßstabsbalken in A und B: 20 μ m

Die Bestimmung der Kernzahl in wildtypischen Testes ergab eine durchschnittliche Anzahl von 3,1 Kernen pro Muskel, wobei der Großteil der naszierenden Myotuben 2 bis 4 Zellkerne besaß (Abb. 23 C und D, Tabelle 1). In seltenen Fällen konnten einkernige Myotuben oder Myotuben mit 5 oder 6 Kernen identifiziert werden. Vergleichbare Zellkernzahlen sind sowohl bei den Kontrollen der nicht getriebenen RNAi-Linien, der Treiber-Linie DMef2-Gal4 und DMef2-Gal4 mit UAS-Dcr2 zu finden (Tabelle 1). In Myotuben, in denen die Proteinmenge von Duf oder Rst reduziert wurde, war auch die Kernzahl im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die zusätzliche Expression von Dcr2 mit dem jeweiligen RNAi-Konstrukt führte zu einer zusätzlichen Reduktion der Kernzahl (Abb. 23 C und D). So stieg die Anzahl ein- und

zweikerniger Testismuskeln von 21% im Wildtyp auf 85% durch den Knock-down von *duf* (bei einer Verstärkung durch *Dcr2*) bzw. auf 70% *rst*-RNAi-Situation mit *Dcr2* (Abb. 23 C und Tabelle 1). Die Testismuskeln hatten in diesen Fällen im Durchschnitt 2 bzw. 2,3 Kerne (Abb. 23 D). Wurden *duf+rst* gleichzeitig herunterreguliert, kam es zu einer stärkeren Reduktion der Zellkernzahl als im Einzel-Knock-down. Außerdem reduzierte auch hier die zusätzliche Expression von *Dcr2* die Zellkernzahl weiter, sodass bei einer durchschnittlichen Kernzahl von 1,6 93% aller naszierenden Myotuben nur einen oder zwei Zellkerne enthielten (Abb. 23 C und Tabelle 1). Trotz der Reduktion der Zellkern-Anzahl sind die knock-down Testes in ihrer äußeren Form nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 23 A und B).

Tabelle 1: Zellkernzahl der Testismuskeln mit RNAi-vermitteltem Knock-down und Kontrollen

Genotyp	Zellkerne pro Testismuskel (n=200)						Durchschnitt
	1	2	3	4	5	6	
Wildtyp (WT)	4	38	104	48	5	1	3,075 ±0,17
DMef2 >> <i>duf</i> -RNAi	2	63	97	36	2	0	2,865 ±0,23
DMef2 >> <i>Dcr2;duf</i> -RNAi	31	140	27	2	0	0	2 ±0,17
DMef2 >> <i>rst</i> -RNAi	4	79	105	12	0	0	2,625 ±0,27
DMef2 >> <i>Dcr2;;rst</i> -RNAi	13	127	56	4	0	0	2,255 ±0,16
DMef2 >> <i>duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	17	124	56	3	0	0	2,225 ±0,22
DMef2 >> <i>Dcr2;duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	95	91	14	0	0	0	1,595 ±0,20
DMef2	3	35	109	48	4	1	3,09 ±0,15
DMef2 >> <i>Dcr2</i>	1	39	113	44	3	0	3,045 ±0,25
<i>duf</i> -RNAi	2	17	123	50	7	1	3,23 ±0,15
<i>rst</i> -RNAi	1	39	114	39	7	0	3,06 ±0,24
<i>duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	3	28	119	46	4	0	3,1 ±0,20

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der RNAi-vermittelte Knock-down von *duf* und/oder *rst* mittels DMef2-Gal4 die Fusionsrate der Testis-Myoblasten reduziert. Die Fusionseffizienz der Testis-Myoblasten scheint daher von Duf und Rst abzuhängen.

5.2.6.4. Die Entwicklung des männlichen Reproduktionstrakts und das Voranschreiten der Spermatogenese erscheint trotz Reduktion der Fusionseffizienz wie im Wildtyp

Da durch den DMef2-vermittelten Knock-down von *duf* und *rst* die Anzahl der Zellkerne in den Testismuskeln reduziert werden konnte, wurde nun untersucht, ob diese Störung in den Testismuskeln die in den Testes stattfindende Spermatogenese beeinflusst. Um dies festzustellen, wurde die Fertilität der männlichen Fliegen nach Reduktion des *duf*-, *rst*- bzw.

duf+rst-Levels analysiert. Dafür wurden in bis zu 30 Kreuzungen jeweils drei wildtypische Weibchen mit einzelnen *duf*-, *rst*- oder *duf+rst* Knock-down Männchen verpaart und ausgewertet, ob Nachkommen gezeugt wurden (Abb. 24 und Tabelle 2).

Tabelle 2: Fertilität bei RNAi-vermitteltem Knock-down von *duf*, *rst* und *duf+rst*

Genotyp	männliche Fertilität		adulte Lebensfähigkeit	Flugfähigkeit
	Gesamtzahl Kreuzungen	davon mit Nachkommen		
Wildtyp (WT)	30	28	ja	ja
DMef2 >> <i>duf</i> -RNAi	30	29	ja	ja
DMef2 >> <i>Dcr2;duf</i> -RNAi	29	29	ja	ja
DMef2 >> <i>rst</i> -RNAi	30	30	ja	ja
DMef2 >> <i>Dcr2;;rst</i> -RNAi	28	26	ja	ja
DMef2 >> <i>duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	30	29	ja	ja
♂ DMef2 >> <i>Dcr2;duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	29	9	ja	nein
♀ DMef2 >> <i>Dcr2;duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	28	2	ja	nein
DMef2	30	29	ja	ja
DMef2 >> <i>Dcr2</i>	27	24	ja	ja
<i>duf</i> -RNAi	29	29	ja	ja
<i>rst</i> -RNAi	29	29	ja	ja
<i>duf</i> -RNAi; <i>rst</i> -RNAi	30	30	ja	ja

Männchen mit reduziertem *duf*- oder *rst*-Level konnten sowohl ohne als auch mit zusätzlicher Expression von *Dcr2* Nachkommen zeugen, was auf eine normale Fertilität hinweist (Abb. 24 und Tabelle 2). Nur die Männchen in denen *duf+rst* gleichzeitig, mit zusätzlicher Verstärkung durch *Dcr2*, herunterreguliert wurden, zeigten eine reduzierte Fertilität. Nur 31% der einzelnen Paare zeugten Nachkommen, wobei in diesen Kreuzungen auch die Anzahl der Nachkommen reduziert war (Abb. 25 A).

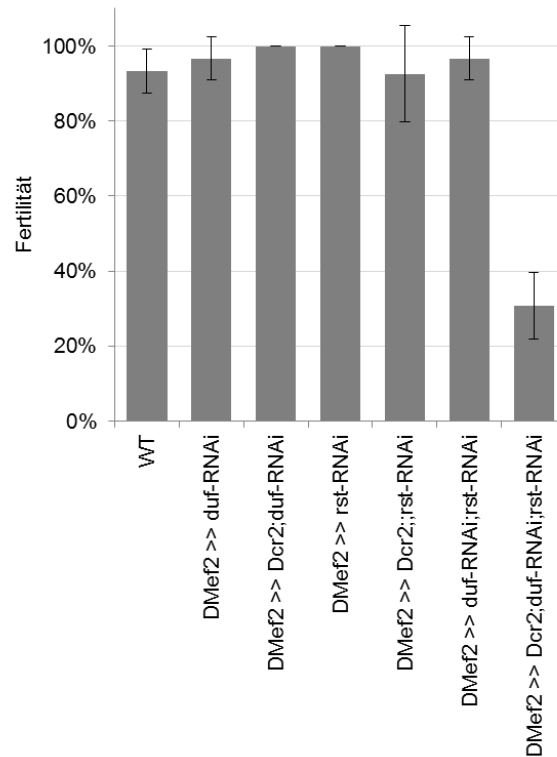


Abb. 24: Nur die Reduktion des *duf+rst*- Levels führt zu verminderter Fertilität

Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 2. Die Männchen mit RNAi-vermitteltem Knock-down von *duf*-, *rst*- oder *duf+rst* wurden einzeln mit wildtypischen Weibchen verpaart. Die Anzahl an zeugungsfähigen *duf*-RNAi oder *rst*-RNAi-Männchen war vergleichbar mit der Anzahl zeugungsfähiger wildtypischer Männchen. Nur Männchen mit Doppel-Knock-down von *duf+rst* mit zusätzlicher Verstärkung durch *Dcr2* können seltener Nachkommen produzieren als wildtypische Männchen.

In adulten Reproduktionstrakten von Männchen nach *duf*-RNAi+*rst*-RNAi vermitteltem Knock-down mit DMef2-Gal4 bei zusätzlicher Expression von *Dcr2* konnten keine sichtbaren Blockaden, Verengungen oder anderweitige Defekte erkannt werden (Abb. 25 B). Die Samenblasen waren gefüllt mit beweglichen Spermien, offensichtliche Defekte in der Spermatogenese wurden nicht beobachtet (Abb. 25 C). Nun wurden wildtypische Weibchen, die mit den RNAi-Männchen verpaart wurden und keine Nachkommen produzierten, genauer untersucht. In den Receptacula seminis dieser Weibchen, also den Organen, in denen die Spermien nach der Kopulation aufbewahrt werden, waren keine Spermien erkennbar (Abb. 25 E). Im Gegensatz dazu sind in Weibchen, die mit wildtypischen Männchen verpaart wurden, die Receptacula seminis mit Spermien gefüllt (Abb. 25 D). Demnach wurden keine Spermien von den RNAi-Männchen auf die Weibchen übertragen.

Im Folgenden wurde die Fruchtbarkeit von Weibchen nach Doppel-Knock-down von *duf+rst* mit Expression von *Dcr2* untersucht: die Fähigkeit dieser Weibchen, Nachkommen zu zeugen war ebenfalls stark reduziert (Tabelle 2). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sowohl

Männchen als auch Weibchen dieses Genotyps zwar laufen und springen konnten, jedoch flugunfähig waren.

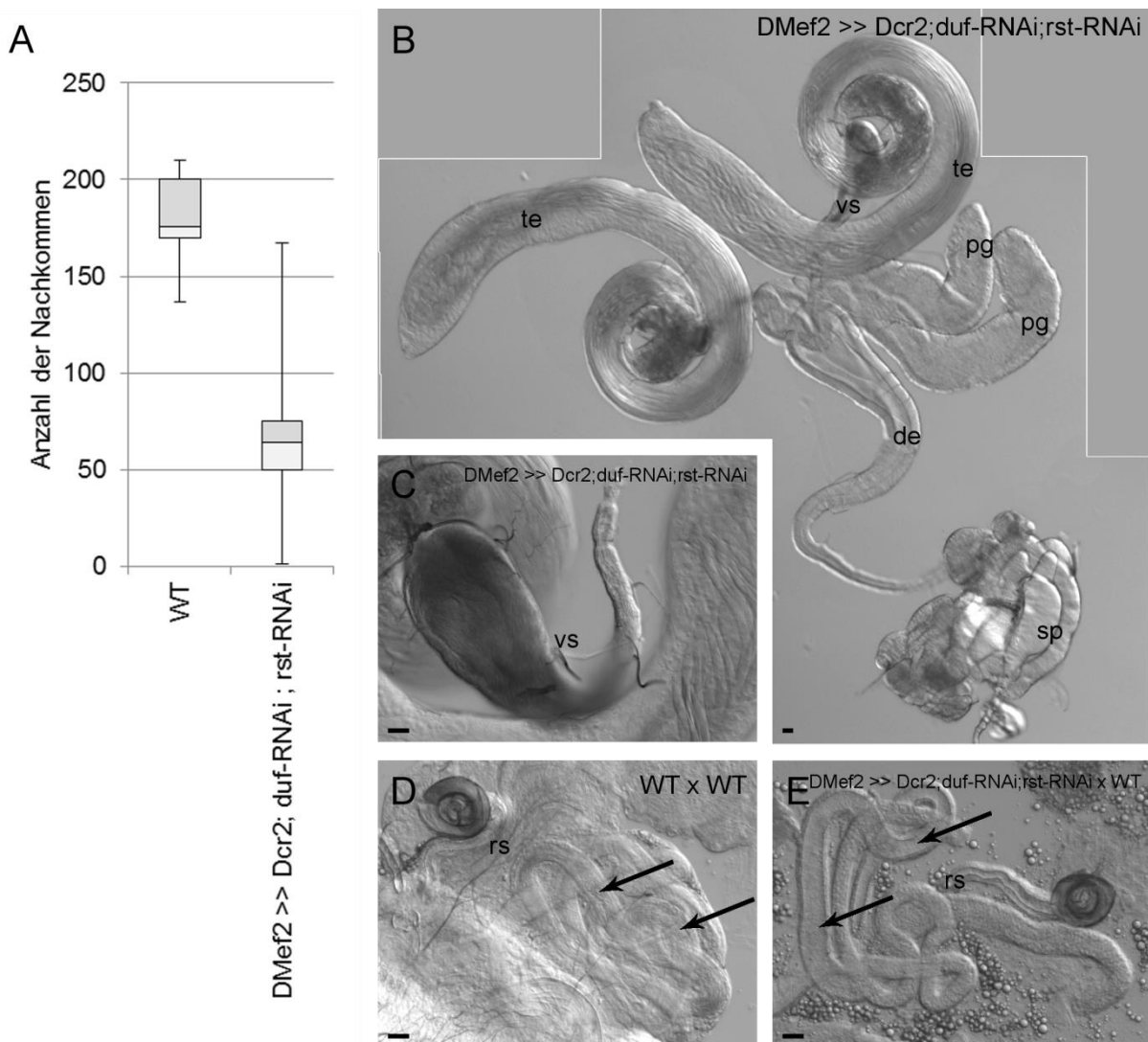


Abb. 25: Es kann keine morphologische Ursache für die Infertilität im *duf+rst* Doppel-Knock-down gefunden werden

Die Boxplot-Darstellung der Nachkommenzahl von Männchen nach RNAi-vermitteltem Knock-down von *duf+rst* mit zusätzlicher Expression von *Dcr2*, die eine Woche mit wildtypischen Weibchen verpaart wurden, zeigt eine Reduktion der Nachkommenanzahl (A). Die Reproduktionstrakte der Knock-down-Männchen zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten (B). Die Spermatogenese scheint vollständig abzulaufen, denn die Samenblasen sind gefüllt mit Spermien (C). Im Gegensatz zu Weibchen, die unter gleichen Bedingungen mit wildtypischen Männchen verpaart wurden (D), haben die Weibchen nach Verpaarung mit den Knock-down-Männchen keine Spermien im Receptaculum seminis (E, Pfeile). Te: Testis; vs: Samenblase; pg: Paragonium, de: Ductus ejaculatorius; sp: Spermienpumpe; rs: Receptaculum seminis. Maßstabsbalken: 20 μ m

Sowohl die Knock-down Männchen als auch die Knock-down Weibchen brachten mit wildtypischen Partnern keine Nachkommen hervor und zeigten weitere Defekte, die nicht die Reproduktionsfähigkeit betrafen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Ablauf der Spermatogenese in diesen Männchen durch die verminderte Kernanzahl in den Testismuskeln

nicht beeinflusst ist. Möglicherweise ist die verminderte Fertilität in Störungen unabhängig vom Reproduktionssystem begründet, beispielsweise beim Paarungsakt.

5.2.6.5. Trotz reduzierter Kernzahl entsteht ein wildtypisches Muskelmuster mit normaler Anordnung der Filamente in den adulten Testes

Um die resultierende Muskulatur der adulten Reproduktionsorgane nach RNAi-vermittelter Herunterregulation von *duf* und/oder *rst* zu untersuchen, wurden die Muskelschichten mit Hoechst und Phalloidin gefärbt (Abb. 26). Zur besseren Verdeutlichung der Muskelzellkerne von Spermienpumpen wurden diese zusätzlich mit anti-DMef2 Antikörpern markiert.

Die Testes nach RNAi-vermitteltem Knock-down besaßen weiterhin die charakteristische, schneckenförmige Morphologie wildtypischer Testes, die analysierten Reproduktionstrakte zeigten keine Defekte, Verengungen oder anderweitige Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 25). Auch die Muskelschichten aller männlichen Reproduktionstrakt-Organen zeigten nach Knock-down von *duf*, *rst*- oder *duf+rst* keine offensichtlichen Defekte (Abb. 26). Trotz Reduktion der Zellkern-Anzahl war die Verteilung der Muskelfasern und Filamente von Testismuskeln auf lichtmikroskopischer Ebene vom Wildtyp nicht zu unterscheiden (Abb. 26 A-D). Auch die Kernzahl der Spermienpumpen-Muskulatur war im Vergleich zum Wildtyp möglicherweise reduziert, wobei die Muskeln in ihrer Morphologie unverändert waren (Abb. 26 Q-T). Auch die einkernigen Muskelschichten von Paragonien und Ductus ejaculatus sowie die Muskeln der Samenblasen waren nicht vom Wildtyp unterscheidbar (Abb. 26 E-P). Die Herunterregulation von *duf*, *rst* oder *duf+rst* führte also nicht zu erkennbaren Veränderungen der Filamentanordnung der inneren Reproduktionsorgane.

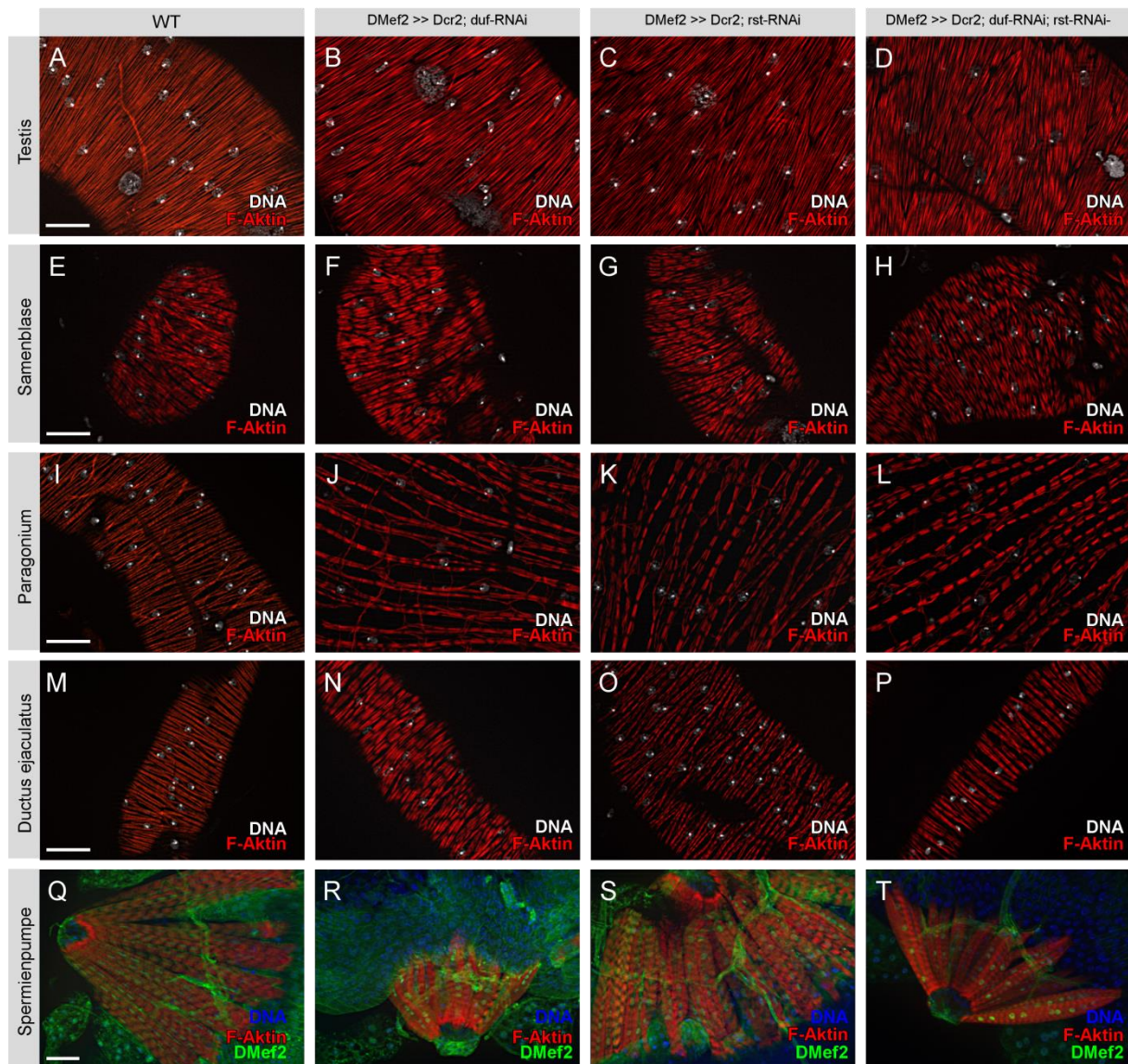


Abb. 26: Die Filamente in adulten männlichen Reproduktionssystemen bei RNAi-vermitteltem Knock-down von *duf*, *rst* und *duf+rst* sind wie im Wildtyp angeordnet

Die adulte Muskulatur des männlichen Reproduktionstrakts zeigt nach Knock-down durch *duf*, *rst* oder *duf+rst* RNAi mit Verstärkung durch *Dcr2* keine Veränderungen der Sarkomere und Filamente im Vergleich zum Wildtyp. F-Aktin der verschiedenen Muskelschichten wurde durch Phalloidin (rot) markiert, DNA wurde mittels Hoechst sichtbar gemacht (A-P: weiß, Q-T: blau). Die Muskelzellkerne der Spermiumpumpen wurden mittels anti-DMef2 Antikörper visualisiert (grün). Maßstabsbalken: 20 µm

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Knock-down einiger IgSF-Proteine zu einer geringeren Zellkernzahl in den Testismuskeln führt. Jedoch hat dies keinen Einfluss auf i) die Migration der naszierenden Myotuben von der entstehenden Samenblase auf den Testis, ii) die Morphogenese der Testes von der larvalen zur adulten Form, iii) die Filamentanordnung und Integrität der Reproduktionstaktmuskulatur und iv) die Produktion reifer Spermien. Daher wird ein Mechanismus postuliert, der eine verminderte Fusionsrate spezifisch in den Testismuskeln kompensieren kann.

6. DISKUSSION

6.1. Der Einfluss von Argk auf die embryonale Myoblastenfusion

Analysen von Proteintrap-Linien konnten zeigen, dass Argk in der embryonalen somatischen Muskulatur während der Myoblastenfusion exprimiert ist (Abb. 7). Diese Daten bestätigen die zuvor durch *in situ* Hybridisierung gezeigte Transkription von *argk* in der embryonalen Muskulatur (siehe Anhang, 8.4; Kuckwa, 2010). Argk::GFP lokalisiert in den Zellkernen der somatischen Muskulatur. Eine nukleäre Lokalisation scheint jedoch für ein am Energiehaushalt beteiligtes Protein nicht passend. Aus diesem Grund wurde ektopisch in Myoblasten exprimiertes Argk-Myc analysiert, da ein solches Fusionsprotein eine zum endogenen Protein vergleichbare subzelluläre Lokalisation aufweisen kann (Bonn et al., 2013). Argk-Myc lokalisiert in zirkulären Strukturen, die zum Teil mit einer Markierung von Mitochondrien überlappen (Abb. 8). Dies scheint schlüssig, da eine Lokalisation von Argk unter anderem an Orten der Energieproduktion zu erwarten ist. Die Lokalisation im Zellkern, die in Proteintrap-Linien detektiert wurde, konnte mit dem Argk-Myc Fusionsprotein nicht bestätigt werden. Häufig entsprechen die GFP-Signale in Proteintrap-Linien der Lokalisation des endogenen Proteins, jedoch sind gelegentlich Fehl-Lokalisationen insbesondere im Zellkern zu beobachten (Buszczak et al., 2007; Quinones-Coello et al., 2007). Aus diesem Grund wird angenommen, dass Argk in räumlicher Nähe zu den Mitochondrien der Muskelzellen und nicht in den Zellkernen lokalisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss veränderter Proteinmengen von Argk auf die embryonale Myogenese untersucht: durch Deletion, ektopische Expression von Argk-Myc oder Expression einer Variante mit potentiell dominant-negativem Effekt konnten keine Defekte in der Myoblastenfusion hervorgerufen werden (Abb. 11). Nicht in allen Fällen sorgt die Deletion einer Myogenesekomponente für Defekte in der Muskelentwicklung. So kann ein funktionell redundantes Protein den Verlust kompensieren, wie es beispielsweise bei Duf und Rst, Rac 1 und Rac2 oder Pak1 und Pak 3 der Fall ist (Duan et al., 2012; Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ruiz-Gómez et al., 2000; Strütkelnberg et al., 2001). CG5144 besitzt als einzige weitere potentielle Argininkinase in *Drosophila* die für die Kinase-Funktion essentiellen Sequenzmotive (siehe Anhang, 8.3). Bei gleichzeitiger Deletion von *argk* und *CG5144* waren keine Defekte in der Myoblastenfusion erkennbar (Abb. 11). Daher gibt es keine Hinweise auf

eine funktionelle Redundanz von CG5144 und Argk. Ein anderer Redundanzpartner ist denkbar, wird jedoch als unwahrscheinlich erachtet, da er die Fähigkeit besitzen müsste, die Phosphagen-Funktion von Argk zu erfüllen. Auch ohne phänotypisch erkennbare Defekte beim Fehlen einer Myogenesekomponente kann für diese Komponente funktionelle Relevanz bestehen. So lokalisiert DSwip-1 abhängig von Sns, Blow und Sing in der Nähe der Fusionsstelle (Hornbruch-Freitag et al., 2011). Sollte Argk abhängig vom Voranschreiten der Fusion aktiviert oder rekrutiert werden, so würde man bei Defekten in der Fusion Veränderungen in der Expression oder Lokalisation, ähnlich wie bei DSwip-1 erwarten. Für Argk konnte keine Lokalisation an der Kontaktstelle der Myoblasten beobachtet werden (Abb. 8). Im Falle eines Defekts der Myoblasten-Adhäsion ist Argk auch weiterhin transkribiert (Abb. 9). Zusätzlich ist in homozygot *sns-* *blow-* oder *wip-*mutanten Embryonen keine zur Wildtyp-Situation veränderte Lokalisation von Argk-Myc erkennbar (Abb. 10).

Zusammenfassend scheint Argk nicht in Abhängigkeit von Komponenten der Myoblastenfusion exprimiert, lokalisiert oder rekrutiert zu werden. Trotz Verlust von Argk verläuft die Myogenese ohne Beeinträchtigung. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Maus gemacht: zwar konnte gezeigt werden, dass CK mittels Phospho-Creatin den Zuwachs der Zellkernanzahl in primären Maus-Myoblasten unterstützt (O'Connor et al., 2008), jedoch sind CK-defiziente Mäuse bei verminderter Leistungsfähigkeit lebensfähig (Übersichtsartikel: Tylkova, 2009). Die Phosphagen-vermittelte Energieversorgung scheint daher nicht essentiell für den Ablauf der Myoblastenfusion und die Muskelentstehung.

6.2. Die Muskulatur des männlichen Reproduktionssystems fusioniert abhängig von Duf und Rst

6.2.1. Die Muskulatur des männlichen Reproduktionstrakts weist Ähnlichkeiten zu verschiedenen bisher beschriebenen Muskeln auf

Zu Beginn der hier dargestellten Analysen war bekannt, dass Muskelschichten den männlichen Reproduktionstrakt umgeben (Bodenstein, 1950). Außerdem konnte ihr Ursprung bereits auf die Genitalscheibe zurückgeführt werden (Kozopas et al., 1998). Jedoch wurden zuvor keine genaueren Charakteristika dieser Muskelschichten beschrieben. In den Untersuchungen von Proteintrap-Linien wurde in Kooperation mit C. Hornbruch-Freitag und L. Susic-Jung (Philipps-Universität Marburg) gezeigt, dass die Muskelschichten der inneren männlichen Reproduktionsorgane sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Abb. 12 und Abb. 13, zusammengefasst in: Abb. 27; Susic-Jung et al., 2012).

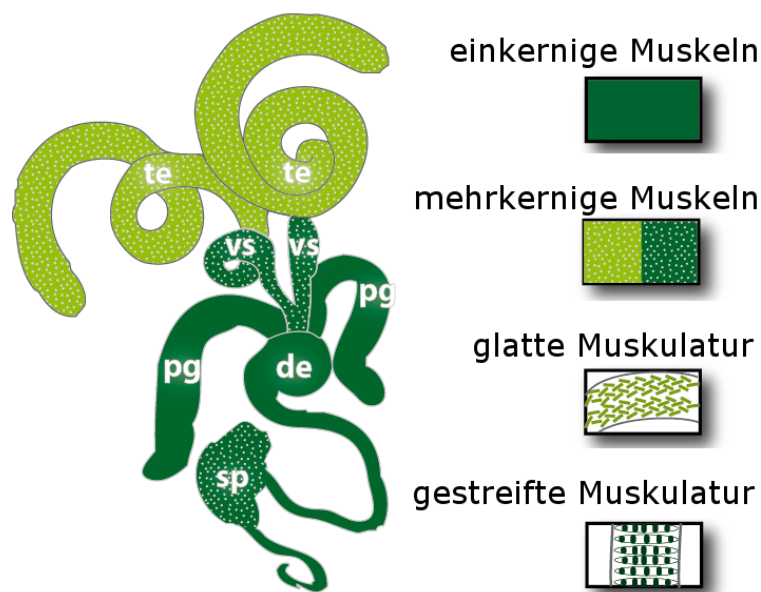


Abb. 27: Die männlichen Reproduktionsorgane sind von verschiedenen Muskelschichten umschlossen

Die Organe des männlichen Reproduktionstrakts sind umgeben von Muskelschichten mit verschiedenen Eigenschaften. Die Muskelhülle der Testes besteht aus mehrkerniger, glatter Muskulatur. Alle anderen untersuchten Muskelschichten bestehen aus quergestreifter Muskulatur, wobei in Paragonien und Ductus ejaculatus nur einkernige Muskeln aufgefunden wurden. Samenblasen und Spermienpumpe enthalten mehrkernige Muskeln. te: Testis; vs: Samenblase; pg: Paragonium; de: Ductus ejaculatus; sp: Spermienpumpe (modifiziert nach Susic-Jung et al., 2012)

Die Muskeln der Spermienpumpe sind dick, tubulär und mehrkernig (Abb. 12 und Abb. 13). Damit weisen sie große Ähnlichkeit beispielsweise zur larvalen somatischen Muskulatur und der IFM adulter Fliegen auf. Sowohl die larvale somatische Muskulatur als auch die IFM

entstehen durch Myoblastenfusion, welche durch die Adhäsion der IgSFs Sns, Hbs, Duf und Rst eingeleitet wird und durch verschiedene Regulatoren des Aktin Zytoskeletts voranschreitet (Dhanyasi et al., 2015; Mukherjee et al., 2011; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Ein ähnlicher Entstehungsprozess ist auch für die Spermienpumpenmuskulatur denkbar. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um die Bildung der Spermienpumpen-Muskulatur aufzuklären.

Die Analyse von Ductus ejaculatus und Paragonium zeigten, dass diese Organe von einer dünnen Schicht aus Muskeln netzartig umhüllt sind (Abb. 12). Auch der larvale Darm von *Drosophila* wird durch ein verwobenes Netzwerk von Muskeln umschlossen (Martin et al., 2001; Rudolf et al., 2014; Schröter et al., 2006). In der viszeralen Muskulatur wurden bisher zwei verschiedene Muskeltypen, zirkuläre und longitudinale Muskeln, beschrieben. Die longitudinalen viszeralen Muskeln sind mehrkernig und entstehen durch Myoblastenfusion (Klapper et al., 2002; Rudolf et al., 2014). Die zirkulären Muskeln sind funktionelle, zweikernige Synzytien, die nach unvollständiger Fusion von zwei Myoblasten durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden sind (Klapper et al., 2002; Martin et al., 2001; Schröter et al., 2006). Im Gegensatz zur larvalen viszeralen Muskulatur konnten für die Muskeln von Ductus ejaculatus und Paragonium keine verschiedenen Muskeltypen identifiziert werden. Des Weiteren wurden um diese Organe keine mehrkernigen Muskeln aufgefunden (Abb. 13 und Abb. 27). Einkernige Muskelschichten wurden auch im weiblichen Reproduktionstrakt identifiziert: Ovariolen sind von einer dünnen Schicht einkerniger, gestreifter Muskeln umgeben (Hudson et al., 2008). Das Ovidukt hingegen wird von mehrkerniger Muskulatur umschlossen (Hudson et al., 2008; Middleton et al., 2006).

Die dünnen, mehrkernigen Muskeln der Testismuskulatur unterscheiden sich in ihrer Filamentanordnung grundlegend sowohl von den anderen Muskeln des Reproduktionstrakts als auch von allen bisher in *Drosophila* untersuchten Muskeln. Auf dem lichtmikroskopischen Niveau ähneln sie glatten Muskeln von Vertebraten, denen die regelmäßige Anordnung der Sarkomere, bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten anhaftend an den Z-Scheiben, fehlt (Au, 2004). Im Gegensatz zur Testismuskulatur von *Drosophila* besitzen die glatten Muskeln der Vertebraten nur einen Zellkern pro Muskel (Ali et al., 2005; Matsumoto und Nagayama, 2012). Auch die Hodenkanälchen von Vertebraten sind umschlossen von einer dünnen Schicht glatter Muskeln, den sogenannten peritubulären Zellen (Albrecht, 2009; Clermont, 1958; Mayerhofer, 2013; Palombi et al., 1992; Ross, 1967). Defekte dieser peritubulären Zellen werden unter anderem mit männlicher Unfruchtbarkeit in Verbindung gebracht (Welter et al., 2013). Aufgrund ihrer besonderen Morphologie, einer möglichen Übertragbarkeit von

Erkenntnissen auf Säugetier-Modelle sowie der leichten Visualisierbarkeit von Defekten (Abb. 22 und Abb. 23), wurden weitere Untersuchungen insbesondere im Hinblick auf die Entstehung der Testismuskulatur durchgeführt.

6.2.2. Die Testis-Myoblasten werden auf der Genitalscheibe determiniert und migrieren erst nach der Fusion auf die Testes

Die Entwicklung der Genitalscheibe wurde in der Vergangenheit insbesondere im Hinblick auf ihren sexuellen Dimorphismus hin untersucht (Bryant, 1978; Chen und Baker, 1997; Nanda et al., 2009). Zur Entstehung der Muskulatur der männlichen Reproduktionsorgane wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. So wurde nach der Untersuchung von DWnt-2-mutanten Männchen in hypomorphen Allelen postuliert, dass die Muskulatur des Testis der Genitalscheibe entstammt, wobei die Pigmentzellen ursprünglich den Gonaden aufsitzen (Kozopas et al., 1998). Durch die Markierung der Myoblasten mittels DMef2-getriebenem GFP konnte dies bestätigt werden: bereits zu Beginn der Metamorphose befinden sich Myoblasten als adeptheliale Zellen auf der wachsenden Genitalscheibe und proliferieren dort (Abb. 14 und Abb. 16). Auf den Testes hingegen sind bis ca. 30 h APF keine Myoblasten detektierbar (Abb. 15 und Abb. 29).

Ob die Genitalscheiben-Myoblasten ebenfalls, wie die Myoblasten der anderen adulten Muskeln, aus dem bereits im Embryo angelegten Pool von ruhenden AMPs stammen (Bate et al., 1991; Roy und VijayRaghavan, 1999), wurde bisher nicht näher analysiert. Jedoch ist es möglich, dass diese Zellen einer anderen bisher nicht identifizierten Gruppe mesodermaler Zellen entstammen, da keine Aktivität des AMP-spezifischen Treibers 1151-Gal4 in Genitalscheiben-Myoblasten nachgewiesen werden konnte.

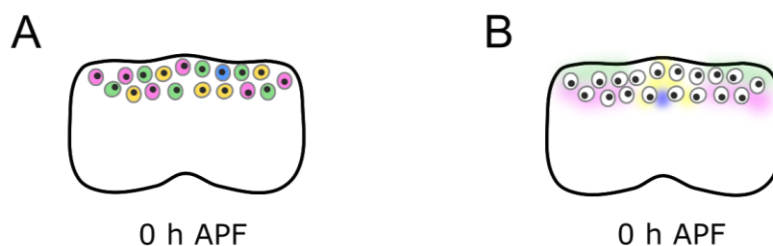


Abb. 28: Möglichkeiten der Determination in schematischer Darstellung

Die Myoblasten der Genitalscheibe könnten bereits zu Beginn der Metamorphose auf ihr zukünftiges Zellschicksal determiniert sein und besiedeln im weiteren Verlauf ihre Ziel-Organe (A). Alternativ könnten „naive“ Myoblasten anhand ihrer Lage durch extrinsische Faktoren erst im Verlauf der Metamorphose determiniert werden (B). Farben verdeutlichen die verschiedenen zukünftigen Muskelschichten.

Weitgehend offen bleibt, wie die Determination der verschiedenen Muskelschichten der Organe des männlichen Reproduktionssystems stattfindet. Für die somatische Muskulatur des Embryos wurde bereits eine Vielzahl von Identitätsgenen identifiziert, die in Kombination miteinander die einzelnen FCs und damit auch die individuellen Muskeln determinieren (zusammengefasst in: de Joussineau et al., 2012; Dobi et al., 2015; Tixier et al., 2010). Die Expression der Identitätsfaktoren wird dabei durch eine Kombination aus anderen Identitätsgenen, Genen der Hox-Familie und extrinsischen Signalen wie Wingless beeinflusst (Capovilla et al., 2001; Cox et al., 2005; Enriquez et al., 2010; Jagla et al., 2002; Knirr et al., 1999). Die Organe des Reproduktionstrakts verfügen über sehr unterschiedlich gestaltete Muskelschichten, wobei sich die einzelnen Muskeln dieser Muskelschichten kaum unterscheiden. Vermutlich erfolgt die Determination der verschiedenen Muskelgruppen durch individuelle Faktoren. Dabei sind zwei verschiedene Szenarien denkbar (Abb. 28): Zum einen könnte das zukünftige Zellschicksal bereits vor der Einwanderung der mesodermalen Zellen in die larvale Genitalscheibe festgelegt werden, wobei die verschieden determinierten Myoblasten gezielt das Ziel-Organ besiedeln, sobald es entsteht. Zum anderen ist eine „naive“ Population von Myoblasten möglich, die anhand ihrer Lage auf dem jeweiligen Organ durch extrinsische Faktoren zu einem späteren Zeitpunkt determiniert werden.

Es ist wahrscheinlich, dass DWnt-2 zur Determination der Testes relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe notwendig ist, da Testes von Mutanten mit hypomorphen DWnt-2 Allelen nur vereinzelte Muskeln enthalten, die im Gegensatz zu wildtypischen Testesmuskeln quergestreift sind (Fender, 2016). Zudem ist auffällig, dass Testes-Myoblasten nach Knock-down des FGF-Rezeptors Heartless vorhanden sind, während alle anderen Myoblasten nicht mehr detektiert werden können ((Fender, 2016). Welche Transkriptionsfaktoren zur Vermittlung der Identität der einzelnen Muskelschichten des Reproduktionstraktes wirken, und damit ihre Identität vermitteln, ist jedoch vollkommen unbekannt. Durch weiterführende Untersuchungen der verschiedenen Identitätsgene des Embryos und ihrer räumlichen und zeitlichen Expression könnten hier weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

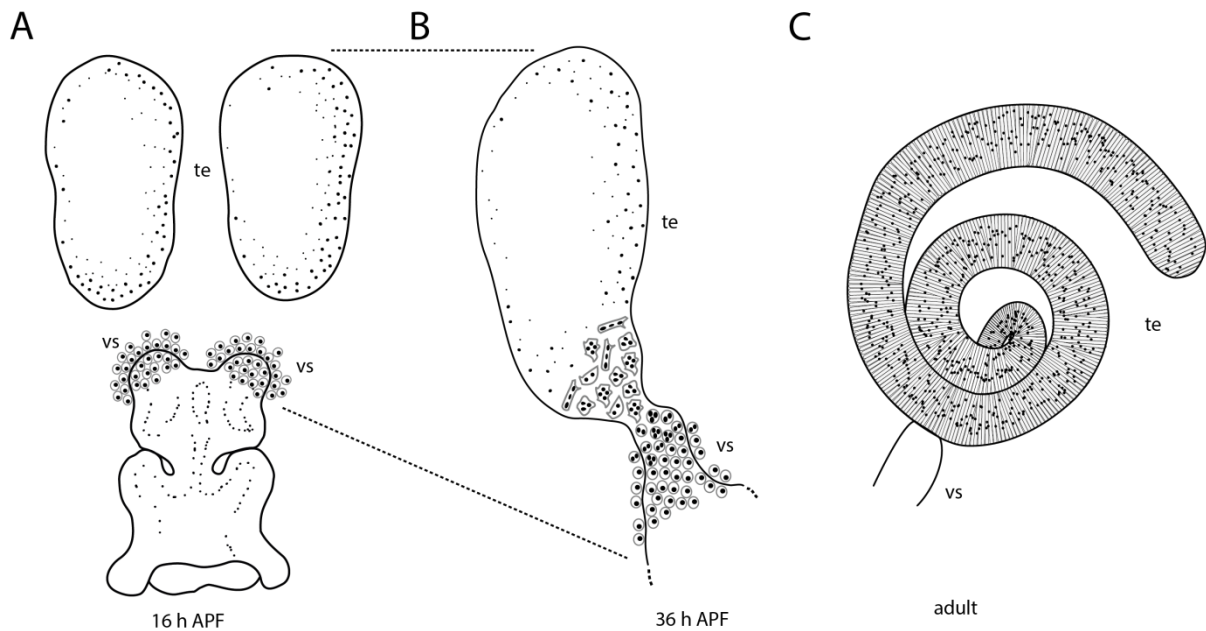


Abb. 29: Schematische Darstellung der Migration der Myotuben auf den Testis

Die zukünftigen Testis-Myoblasten entstammen der Genitalscheibe (A). Nach der Kontaktaufnahme der entstehenden Samenblase mit dem Testis wandern die Muskelvorläufer bereits mehrkernig auf den Testis auf (B). Im weiteren Verlauf der Entwicklung elongieren die Myotuben, bis der Testis vollständig umschlossen ist (C). (Kuckwa et al., 2016)

Der Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 an Serin 10 sowie der Nachweis von DNA-Replikation mittels EdU in Genitalscheiben konnte zeigen, dass die Myoblasten nach der Determination zu Myoblasten eine Amplifikationsphase auf der Genitalscheibe durchlaufen (Abb. 16). Die zukünftigen Testis-Muskelzellen migrieren erst nach der Fusion auf die Testes und elongieren dort (Abb. 17 und Abb. 29). Verschiedene Signalwege können die Migration von Zellen steuern. So gibt es erste Hinweise auf die Beteiligung von Komponenten des FGF-Signalwegs an der Migration (Fender, 2016). Auch die Aktivität des Wnt-Signalwegs ist denkbar, da in Wnt-mutanten Männchen eine fehlende Verbindung der Testes zur Genitalscheibe beobachtet wurde (Kozopas et al., 1998). Das extrazelluläre Matrix Protein Trol kann Einfluss auf die Verteilung von Komponenten des Wnt-Signalwegs nehmen (Kamimura et al., 2013). Anhand einer Proteintrap-Linie konnte gezeigt werden, dass Trol auch im adulten männlichen Reproduktionstrakt exprimiert ist (Abb. 13). Auch 20 h APF ist Trol auf Genitalscheiben nachweisbar (siehe Anhang, 8.8). Die Beteiligung eines extrazellulären Matrix-Proteins wie beispielsweise Trol in Zusammenhang zum Wnt-Signalweg an der Migration der Testis-Myoblasten ist aus diesem Grund denkbar.

6.2.3. Die glatte Testismuskulatur entsteht durch Zell-Zell-Fusion

Da sich die Testismuskulatur stark von allen in *Drosophila* bisher untersuchten Muskeln unterscheidet, stellt sich die Frage, ob die Entstehung dieser Muskulatur ebenfalls abweicht. Mehrkernige Zellen entstehen grundsätzlich durch Zell-Zell-Fusion oder das Auslassen der Zellteilung nach einer Kernteilung (Gentric und Desdouets, 2014; Lacroix und Maddox, 2012). Alle bisher in *Drosophila* beschriebenen mehrkernigen Muskeln entstehen durch Fusion der Myoblasten (zusammengefasst in: Schulman et al., 2015). Im Gegensatz dazu entstehen die binukleären Epithelzellen der Paragonien durch unvollständige Zytokinese (Taniguchi et al., 2014). Auch Mischformen sind möglich: für Garland-Zellen Nephrozyten wurde diskutiert, dass sie Zellfusionsdefekte durch Auslassen der Zytokinese nach Mitose ausgleichen könnten (Zhuang et al., 2009).

Durch *in vivo*-Nachweis von DNA-Replikation mittels EdU-Markierung konnte ein Zusammenhang von mitotischer Aktivität und mehrkernigen Testismuskeln ausgeschlossen werden (Abb. 18). Außerdem sprechen die Anwesenheit der IgSFs (Abb. 21) und die verminderte Zellkern-Anzahl in der *duf*- und *rst*-Knock-down-Situation (Abb. 23) für einen Myoblastenfusions-Prozess bei der Entstehung der Testismuskulatur und zeigt gleichzeitig weitere Parallelen zur Entwicklung der embryonalen Muskulatur auf. Ergänzend dazu zeigte sich bei der Analyse des *duf*-Reporterkonstrukts *rp298-lacZ* in Muskeln der pupalen Testes eine unterschiedliche Expression von β -Galaktosidase in den verschiedenen Kernen eines Muskels, was auf einen Ursprung aus mehreren Zellen hindeutet (Kuckwa et al., 2016). Ähnliche Beobachtungen wurden in den zweikernigen zirkulären Darmmuskeln des Embryos gemacht: im Gegensatz zur somatischen Muskulatur (Menon et al., 2005) ist hier nach der Fusion nur jeweils ein Zellkern *rp298*-positiv (Klapper et al., 2002; Rudolf et al., 2014). Da die Testismuskeln, ähnlich wie die zirkuläre viszerale Muskulatur über weitaus weniger Kerne als die larvalen Körperwandmuskeln verfügen, sind weitere Parallelen in den Entstehungsprozessen denkbar.

6.2.4. Testis-Myoblasten sind eine heterogene Population mit FC- und FCM-artigen Zellen, bei deren Fusion es keine Hinweise auf die Ausbildung von FuRMAS gibt

Mit den vorliegenden Daten wurde gezeigt, dass Myoblasten fusionieren, um die Testismuskulatur zu bilden. Weiterhin offen bleibt die Frage, wie sich der Fusionsmechanismus der Testis-Myoblasten konkret darstellt. Andere Myoblastenfusions-Prozesse in *Drosophila* weisen die Fusion heterotypischer Zellen auf, wobei in der Regel eine *Duf*-positive FC bzw.

Myotube mit mehreren Sns-positiven FCMs fusioniert, um den Muskel zu bilden (Bour et al., 2000; Dutta et al., 2004; Gildor et al., 2012; Ruiz-Gómez et al., 2000; Rushton et al., 1995; Soler et al., 2004; Strükelberg et al., 2001). Obwohl es auch in Vertebraten Hinweise auf die Beteiligung von IgSF-Proteinen an der Myoblastenfusion gibt, konnten bisher keine Unterschiede in den Myoblasten identifiziert werden. Hier wird eine homotypische Zellfusion angenommen (Übersichtsartikel: Abmayr und Pavlath, 2012; Kim et al., 2015).

Die Auswertung von Reporter-Konstrukten für *duf* und *sns* weist auf eine Expression beider IgSFs vor, während und nach der Testis-Myoblastenfusion hin. Dabei konnten verschiedene Expressionsmuster der beiden Konstrukte gezeigt werden, wobei sich die räumliche Verteilung von Duf und Sns zu der im Embryo zu unterscheiden scheint (Abb. 21). Studien mit Antikörpernachweisen der IgSFs Duf, Sns und Rst zeigten zwei Schichten von Zellen mit unterschiedlichem Expressionsmuster auf den zukünftigen Samenblasen, die auf FC- und FCM-ähnliche Eigenschaften schließen lassen (Abb. 30; Kuckwa et al., 2016). Die Testes-Myoblasten wurden infolgedessen als FC- und FCM-artige Zellen charakterisiert.

Im Gegensatz zum Embryo wurde in den Testis-Myoblasten keine ringförmige Lokalisation der Adhäsionsmoleküle beobachtet, die auf die Anwesenheit von FuRMAS hinweisen könnte (Kuckwa et al., 2016). Erste Daten zeigten vereinzelte Aktin-Foci auf den Spitzen der Samenblasen (Abb. 19). Die seltenen Foci wurden jedoch einige Stunden vor Ablauf der ersten Myoblastenfusionen beobachtet. Zum Zeitpunkt der Fusion konnten keine F-Aktin Anreicherungen beobachtet werden, die Ähnlichkeit zur FuRMAS aufweisen (Fritzen, 2017). FuRMAS wurden bisher nur im Verlauf der Bildung der somatischen Muskulatur im Embryo beobachtet (Kesper et al., 2007; Rochlin et al., 2010; Sens et al., 2010; Önel et al., 2011). Bei der Entstehung der viszeralen Muskulatur oder der IFM konnten zwar die in der FuRMAS lokalisierenden Signalmoleküle identifiziert werden, jedoch wurde bisher keine ringförmige Anordnung dieser oder das Auftreten der elektronendichten Strukturen beobachtet (Dhanyasi et al., 2015; Gildor et al., 2012; Mukherjee et al., 2011; Rudolf et al., 2014; Schröter et al., 2006).

Auch in den Testis-Myoblasten konnte bisher keine ringförmige Anordnung der Zelladhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. Die IgSFs lokalisieren hier, genauso wie Regulatoren der verzweigten F-Aktin Polymerisation, auf der gesamten Oberfläche der Zellmembran (persönliche Kommunikation D. Buttgereit; Fritzen, 2017; Kuckwa et al., 2016). Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Ablauf der heterotypischen Testis-Myoblastenfusion eher der Entstehung der Darm- oder Thoraxmuskulatur ähnelt.

6.2.5. Die Fusion ist begrenzt auf die anterioren Spitzen der entstehenden Samenblasen

Bei der Beobachtung der Myoblastenfusion auf den zukünftigen Samenblasen zeigte sich, dass die Fusion zunächst auf einen kleinen Bereich an der anterioren Spitze begrenzt ist (Abb. 17 und Abb. 29). Weiterhin konnte in diesem Bereich keine mitotische Aktivität der Myoblasten festgestellt werden (Abb. 16). Die auf dem Testis ankommenden Muskeln waren bereits mehrkernig, wobei es keine Hinweise auf Fusionsprozesse auf dem Testis gibt (Abb. 17). Es scheint also, dass die Myoblasten vor der Migration auf den Testis räumlich stark begrenzt fusionieren. Die für die Fusion benötigten Zelladhäsionsmoleküle sind bereits lange vorher in den nebeneinander liegenden Myoblasten und auch in den Myoblasten auf den zukünftigen Paragonien exprimiert (Abb. 21; Kuckwa et al., 2016). Dies stimmt überein mit Zellkultur-Versuchen, in denen gezeigt werden konnte, dass die IgSFs allein nicht ausreichen, um Zellfusion auszulösen (Shilagardi et al., 2013). In anderen Fusionsprozessen, wie der Entstehung der Hypodermis in *C. elegans* oder der Virus-Zell-Fusion, sind Schlüssel-Regulatoren wie z.B. EFF-1, sogenannte Fusogene, benötigt und ausreichend, um die Fusion auszulösen (zusammengefasst in: Aguilar et al., 2013). Zuvor wurde vermutet, dass in *Drosophila* ein bisher unidentifiziertes Fusogen aus dem Golgi-Apparat mittels der beobachteten elektronendichten Vesikel zum Zeitpunkt der Myoblastenfusion zur Membran transportiert wird und dort die Fusion auslöst (Kim et al., 2007). Bis heute konnte jedoch kein solches Fusogen in Myoblasten identifiziert werden. Bei der Entstehung der Testismuskeln müsste die Expression des mutmaßlichen Fusogens einer sehr strengen räumlichen und zeitlichen Regulation unterliegen, um die Fusion auf die vorderen Spitzen der Samenblasen zu initiieren. Alternativ ist ein extrinsisches Signal denkbar, dass gezielt die Fusion der Myoblasten auslöst. So könnte beispielsweise der Kontakt zum Samenblasenepithel, ein sekretierter Faktor aus den terminalen Epithelzellen des Testis, aus den männlich-spezifischen Pigmentzellen oder aus dem umliegenden Fettgewebe ein solches Signal darstellen. Diese Hypothese könnte beispielsweise durch *ex vivo* Ko-Kulturen von Genitalscheiben zusammen mit verschiedenen anderen Geweben überprüft werden. So gewonnene Erkenntnisse könnten möglicherweise auch auf die embryonale Myoblastenfusion oder die Muskelentstehung im Vertebraten übertragen werden.

6.2.6. Bei der Bildung der Testismuskulatur könnten Duf und Rst unabhängig voneinander agieren

Proteine der IgSF-Familie sind für die Erkennung und Anheftung der fusionierenden Myoblasten bei der Entwicklung der larvalen Muskulatur (Bour et al., 2000; Klapper et al., 2002; Ruiz-Gómez et al., 2000; Shelton et al., 2009; Strükelberg et al., 2001), der Bein-Muskulatur (Soler et al., 2004), der IFM (Gildor et al., 2012) und der abdominalen Muskeln (Dutta et al., 2004) essentiell. Der Knock-down von *duf* und *rst* (Abb. 23) sowie *sns* (Kuckwa et al., 2016) während der Metamorphose führt auch in den entstehenden Testismuskeln zu einer verminderten Fusionsrate. Daher scheinen IgSF-Proteine auch an der Fusion der Testis-Myoblasten beteiligt zu sein. Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheidet sich die Wirkungsweise von Duf und Rst in den verschiedenen Systemen. Nur das gleichzeitige Fehlen beider Gene führt bei der embryonalen Myoblastenfusion zu erkennbaren Defekten (Ruiz-Gómez et al., 2000; Strükelberg et al., 2001). Dieser Defekt kann durch das Wiedereinbringen von entweder Duf oder Rst behoben werden (Strükelberg et al., 2001). Auch bei der Entwicklung der Thorax-Muskulatur während der Metamorphose agieren Duf und Rst redundant: Die Myoblasten fusionieren beim Knock-down von *duf* wie im Wildtyp, wobei durch den doppelten Knock-down von *duf* und *rst* Flugmuskeln mit starken Fusionsdefekten entstehen (Gildor et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte in der Testismuskulatur auch eine reduzierte Kernanzahl festgestellt werden, wenn ein Einzel-Knock-down von *duf* oder *rst* vorlag. Die gleichzeitige Verminderung beider Komponenten verstärkte den Fusionsdefekt (Abb. 23). Des Weiteren kommt es zu Störungen der Filamentanordnung bei der Expression von *duf*-, *sns*- und *hbs*-RNAi nach der Fusion in der Muskelhülle, jedoch nicht bei *rst*-RNAi (Abb. 22).

Die IgSF-Proteine sind neben der Myoblastenfusion auch an anderen Entwicklungsprozessen beteiligt. So wurde beschrieben, dass beide Proteine essentiell für die Bildung der Slit Diaphragma-ähnlichen Struktur der Nephrocyten sind (Weavers et al., 2009; Zhuang et al., 2009). Außerdem werden Duf und Rst während der Augenentwicklung zur Anordnung der Ommatidien benötigt (Ramos et al., 1993; Reiter et al., 1996). Hier agieren sie jedoch nicht redundant: beim Knock-down von *duf* oder *rst* entstehen Defekte, die beim gleichzeitigen Fehlen beider Proteine verstärkt werden (Bao et al., 2010). Die Funktionsweise der Adhäsionsmoleküle in den Testis-Myoblasten scheint ähnlich zur Entwicklung des Auges und abweichend zu anderen bisher untersuchten Myoblastenfusions-Prozessen. Die Knock-down Studien lassen auf eine nicht redundante Wirkungsweise von Duf und Rst bei der Entstehung

der Testismuskeln schließen. Dieser grundlegende Unterschied könnte den ersten Hinweis auf alternative Mechanismen bei der Myogenese darstellen.

6.2.7. In Testismuskeln mit reduzierter Zellkern-Anzahl kommt es zu korrekter Filament-Organisation, Formgebung der Testes und männlicher Fertilität

Trotz einer verminderten Fusionseffizienz durch den Knock-down von *duf* oder *rst* während der Entstehung der Testismuskeln wurden keine Defekte bei der Ausbildung des Reproduktionstrakts oder beim Ablauf der Spermatogenese beobachtet (Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26). Im Gegensatz dazu wurden bisher sowohl in *Drosophila* als auch in Vertebraten bei einer Störung der Myoblastenfusion schwere Defekte bei der Entstehung der gestreiften Muskeln beobachtet, die häufig mit embryonaler Lethalität einhergeht (Übersichtsartikel: Abmayr und Pavlath, 2012; Rochlin et al., 2010; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Auch im männlichen Reproduktionssystem wurde beschrieben, dass Defekte bei der Morphogenese männliche Sterilität hervorrufen kann (Linnemannstöns et al., 2014).

Trotz reduzierter Zellkern-Anzahl waren in den Knock-down Testes die Samenblasen immer mit den Testes verbunden und Muskeln vollständig auf die Testes gewandert (Abb. 25 und Abb. 30). Die Filamentanordnung in diesen Fliegen erschien auf lichtmikroskopischer Ebene wildtypisch, unabhängig vom Grad des Fusionsdefekts (Abb. 26). Aus diesem Grund scheint eine vollständig ablaufende Myoblastenfusion nicht für die weitere Entwicklung der Testes sowie die Anordnung und Anheftung der Testismuskeln und die Bildung der Filamente benötigt. Möglicherweise liegt hier ein kompensierender Mechanismus zu Grunde, der auch bei Störungen der Muskelbildung die Fertilität der Männchen sicherstellt. Diese Vermutung wird gestützt durch Beobachtungen in den schnell kontrahierenden Muskelfasern des Zebrafischs: Beim Fehlen der beiden interagierenden Zelladhäsions-Proteine Jamb und Jamc verbleiben die sonst dreikernigen Muskeln einkernig, wobei dennoch die Elongation der Muskeln und die Sarkomer-Entstehung beobachtet werden können (Powell und Wright, 2011).

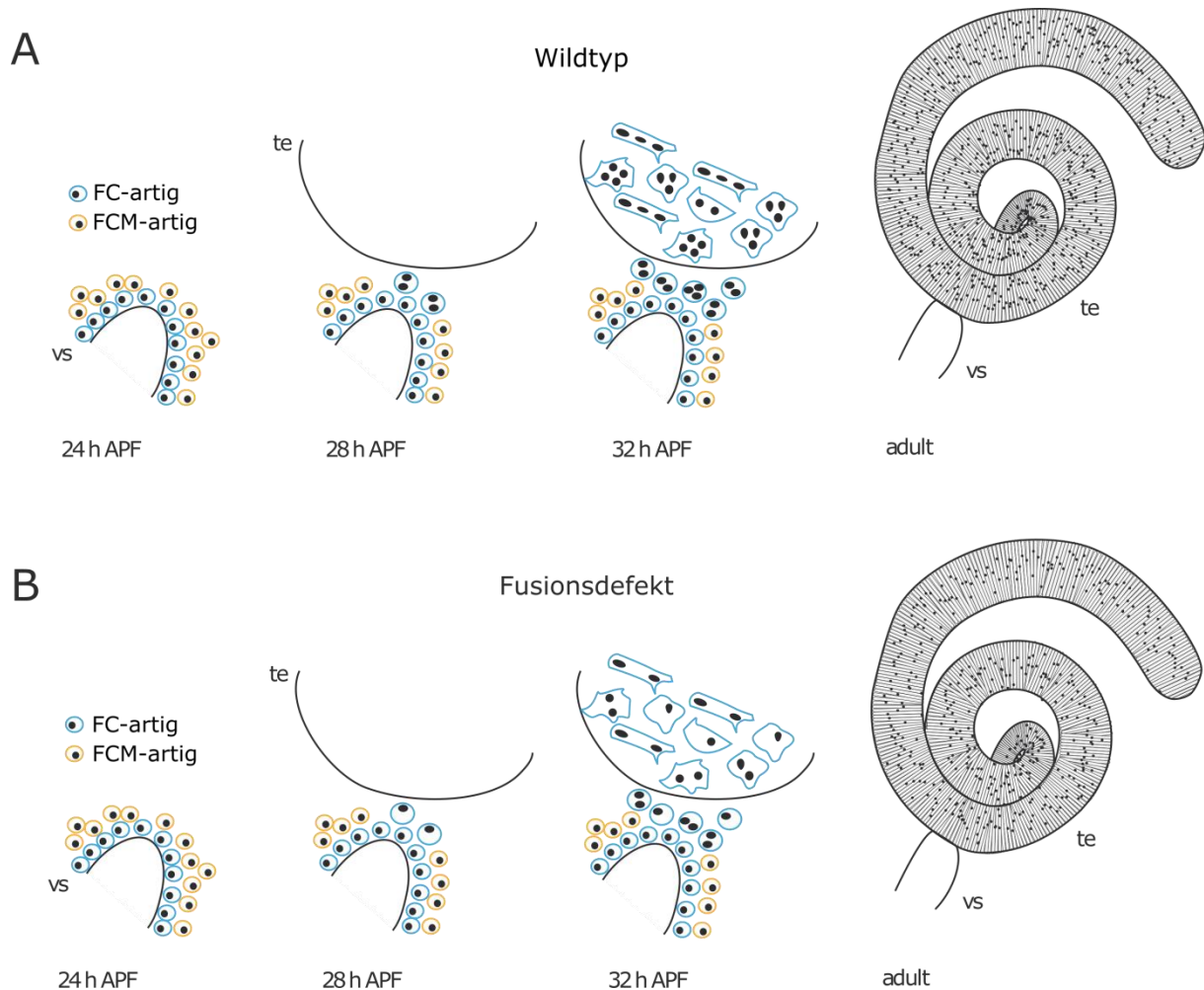


Abb. 30: Schematische Darstellung der Kompensation von Myoblastenfusionsdefekten

Durch heterotypische Zellfusion von FC-artigen mit FCM-artigen Myoblasten entstehen mehrkernige, naszierende Myotuben, die im Anschluss an die Fusion auf den Testis migrieren (A). Im Falle eines Fusionsdefekts, hervorgerufen durch den Knockdown von *duf* und *rst*, migrieren die naszierenden Myotuben trotz reduzierter Zellkern-Anzahl auf den Testis und umschließen ihn vollständig (B). (Kuckwa et al., 2016)

6.2.8. Ausblick

Die Entstehung der Testismuskulatur stellt ein neues Modell zur Untersuchung der Myogenese dar. Analysen, die im Embryo z.B. aufgrund von Redundanzen oder maternalen Komponenten bisher nicht möglich waren, könnten so mit alternativen Methoden im adulten System fortgeführt werden. Methoden wie z.B. die Isolation von Myoblasten mittels magnetischer Beads, die für die Untersuchung der Reproduktionstrakt-Muskulatur entwickelt wurden, könnten auch im Embryo Einsatz finden. Da die Bildung der adulten Muskeln in einigen Aspekten von der Myogenese im Embryo abweicht, könnten Gemeinsamkeiten bei den Abläufen und den Signalmolekülen weiteren Aufschluss über prinzipielle Mechanismen zur Muskelentstehung liefern und möglicherweise auf Vertebraten-Modelle übertragen werden.

Dafür ist es wichtig, den Prozess der Testis-Myoblastenfusion besser zu verstehen sowie Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur somatischen und viszerale Muskulatur zu erkennen.

Wichtige, noch offene Fragen sind, wie die Determination der verschiedenen Myoblasten auf der Genitalscheibe erfolgt, wie die Fusion zeitlich und räumlich reguliert wird, wie die Signaltransduktion nach Kontaktaufnahme der IgSFs in den Testis-Myoblasten abläuft und ob es Signalzentren, ähnlich der FuRMAS gibt. Diese Fragen könnten durch weitere Knock-down Analysen der im Embryo charakterisierten FC-Identitätsgene und wichtiger Komponenten der embryonalen Myoblastenfusion wie beispielsweise Rols, Kette, Blow oder Sing evtl. zusätzlich durch die Lebend-Beobachtung der Myoblasten geklärt werden. Mögliche Effekte von RNAi-Konstrukten im Embryo oder auf Determinationsprozesse der adulten Muskeln könnte dabei durch die Nutzung der Gal80ts/TARGET-Systems umgangen werden (McGuire et al., 2004).

Die bisherigen Analysen befassen sich hauptsächlich mit der Entstehung der Reproduktionstrakt-Muskulatur. Ob diese Muskelschichten die Fähigkeit besitzen zu kontrahieren, ist weiterhin unbekannt. Sowohl die peritubulären Zellen der Vertebraten als auch die Muskelschichten der Ovarien sind kontraktile (Clermont, 1958; Middleton et al., 2006). Ein Versuchsaufbau analog der in Middleton et al. 2006 dargestellten Experimente könnte die Kontraktionsfähigkeit der Reproduktionstrakt-Muskulatur nachweisen.

Die Migration der entstehenden Muskeln auf den Testis erscheint funktionell unabhängig von der vorher stattfindenden Myoblastenfusion. Welche Faktoren für die korrekte Migration der Testismuskeln sorgen, ist weitgehend unbekannt. Zellmigration ist stark mit Umstrukturierungen des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts verknüpft (zusammengefasst in: Coles und Bradke, 2015). Da die Reorganisation von F-Aktin auch mit Myoblasten-Fusionsprozessen verbunden ist, scheint eine duale Funktion bei Fusion und Migration möglich. Für Mikrotubuli-assoziierte Faktoren konnte im Embryo ein Zusammenhang zur Positionierung der Zellkerne gezeigt werden (Folker et al., 2012, 2014; Metzger et al., 2012; Schulman et al., 2014). Welche Rolle die Mikrotubuli und das Aktin-Zytoskelett bei der Entstehung der Testismuskulatur spielen, könnte durch weitere Knock-down Studien oder *ex vivo* Kulturen unter Verwendung von Inhibitoren bei Lebend-Beobachtung oder durch Injektion von Inhibitoren in die Puppen näher untersucht werden. Mittels solcher Kultur-Experimente könnte auch der Einfluss von Signalwegen wie Wnt, Notch oder FGF auf die Migration der naszierenden Myotuben genauer analysiert werden.

7. LITERATUR

- Abmayr, S. M., and G. K. Pavlath, 2012, Myoblast fusion: lessons from flies and mice: *Development*, v. 139, p. 641-56.
- Aguilar, P. S., M. K. Baylies, A. Fleissner, L. Helming, N. Inoue, B. Podbilewicz, H. Wang, and M. Wong, 2013, Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms: *Trends Genet*, v. 29, p. 427-37.
- Albrecht, M., 2009, Insights into the nature of human testicular peritubular cells: *Ann Anat*, v. 191, p. 532-40.
- Aldaz, S., L. M. Escudero, and M. Freeman, 2010, Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 14217-22.
- Ali, F., P. D. Pare, and C. Y. Seow, 2005, Models of contractile units and their assembly in smooth muscle: *Can J Physiol Pharmacol*, v. 83, p. 825-31.
- Andrews, L. D., J. Graham, M. J. Snider, and D. Fraga, 2008, Characterization of a novel bacterial arginine kinase from *Desulfotalea psychrophila*: *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 150, p. 312-9.
- Artero, R., E. E. Furlong, K. Beckett, M. P. Scott, and M. Baylies, 2003, Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis: *Development*, v. 130, p. 6257-72.
- Atreya, K. B., and J. J. Fernandes, 2008, Founder cells regulate fiber number but not fiber formation during adult myogenesis in *Drosophila*: *Dev Biol*, v. 321, p. 123-40.
- Attrill, H., K. Falls, J. L. Goodman, G. H. Millburn, G. Antonazzo, A. J. Rey, and S. J. Marygold, 2016, FlyBase: establishing a Gene Group resource for *Drosophila melanogaster*: *Nucleic Acids Res*, v. 44, p. D786-92.
- Au, Y., 2004, The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere: *Cell Mol Life Sci*, v. 61, p. 3016-33.
- Awe, S., and R. Renkawitz-Pohl, 2010, Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*: *Syst Biol Reprod Med*, v. 56, p. 44-61.
- Azpiazu, N., P. A. Lawrence, J. P. Vincent, and M. Frasch, 1996, Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm: *Genes Dev*, v. 10, p. 3183-94.
- Azzi, A., S. A. Clark, W. R. Ellington, and M. S. Chapman, 2004, The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase: *Protein Sci*, v. 13, p. 575-85.
- Bao, S., K. F. Fischbach, V. Corbin, and R. L. Cagan, 2010, Preferential adhesion maintains separation of ommatidia in the *Drosophila* eye: *Dev Biol*, v. 344, p. 948-56.
- Bate, M., 1990, The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*: *Development*, v. 110, p. 791-804.
- Bate, M., 1993, The Mesoderm and Its Derivatives, in M. Bate, and A. Martinez-Arias, eds., *The Development of Drosophila melanogaster*: Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press., p. 1013-1090.
- Bate, M., E. Rushton, and D. A. Currie, 1991, Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*: *Development*, v. 113, p. 79-89.
- Baylies, M. K., and M. Bate, 1996, twist: a myogenic switch in *Drosophila*: *Science*, v. 272, p. 1481-4.

- Beckett, K., and M. K. Baylies, 2007, 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion: *Dev Biol*, v. 309, p. 113-25.
- Berger, S., G. Schäfer, D. A. Kesper, A. Holz, T. Eriksson, R. H. Palmer, L. Beck, C. Klämbt, R. Renkawitz-Pohl, and S. F. Onel, 2008, WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion: *J Cell Sci*, v. 121, p. 1303-13.
- Bodenstein, D., 1950, The postembryonic Development of *Drosophila*, in M. Demerec, ed., *Biology of Drosophila*: New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 275-367.
- Bonn, B. R., A. Rudolf, C. Hornbruch-Freitag, G. Daum, J. Kuckwa, L. Kastl, D. Buttgereit, and R. Renkawitz-Pohl, 2013, Myosin heavy chain-like localizes at cell contact sites during *Drosophila* myoblast fusion and interacts in vitro with Rolling pebbles 7: *Exp Cell Res*, v. 319, p. 402-16.
- Bour, B., M. Chakravarti, J. West, and S. Abmayr, 2000, *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion.: *Genes Dev*, v. 14, p. 1498-511.
- Bour, B. A., M. A. O'Brien, W. L. Lockwood, E. S. Goldstein, R. Bodmer, P. H. Taghert, S. M. Abmayr, and H. T. Nguyen, 1995, *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis: *Genes Dev*, v. 9, p. 730-41.
- Brand, A., and N. Perrimon, 1993, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.: *Development*, v. 118, p. 401-15.
- Bryant, P. J., 1978, Pattern Formation in Imaginal Discs., in Ashburner, and Wright, eds., *The Genetics and Biology of Drosophila*, v. 2c, Academic Press.
- Bryantsev, A. L., P. W. Baker, T. L. Lovato, M. S. Jaramillo, and R. M. Cripps, 2012, Differential requirements for Myocyte Enhancer Factor-2 during adult myogenesis in *Drosophila*: *Dev Biol*, v. 361, p. 191-207.
- Burkart, C., F. Qiu, S. Brendel, V. Benes, P. Haag, S. Labeit, K. Leonard, and B. Bullard, 2007, Modular proteins from the *Drosophila* sallimus (sls) gene and their expression in muscles with different extensibility: *J Mol Biol*, v. 367, p. 953-69.
- Buszczak, M., S. Paterno, D. Lighthouse, J. Bachman, J. Planck, S. Owen, A. D. Skora, T. G. Nystul, B. Ohlstein, A. Allen, J. E. Wilhelm, T. D. Murphy, R. W. Levis, E. Matunis, N. Srivali, R. A. Hoskins, and A. C. Spradling, 2007, The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies: *Genetics*, v. 175, p. 1505-31.
- Cantwell, J. S., W. R. Novak, P. F. Wang, M. J. McLeish, G. L. Kenyon, and P. C. Babbitt, 2001, Mutagenesis of two acidic active site residues in human muscle creatine kinase: implications for the catalytic mechanism: *Biochemistry*, v. 40, p. 3056-61.
- Capovilla, M., Z. Kambris, and J. Botas, 2001, Direct regulation of the muscle-identity gene *apterous* by a Hox protein in the somatic mesoderm: *Development*, v. 128, p. 1221-30.
- Carlsson, A. E., 2010, Actin dynamics: from nanoscale to microscale: *Annu Rev Biophys*, v. 39, p. 91-110.
- Carmena, A., M. Bate, and F. Jimenez, 1995, Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis: *Genes Dev*, v. 9, p. 2373-83.
- Carmena, A., S. Gisselbrecht, J. Harrison, F. Jimenez, and A. M. Michelson, 1998, Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm: *Genes Dev*, v. 12, p. 3910-22.
- Carrasco-Rando, M., and M. Ruiz-Gómez, 2008, Mind bomb 2, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability.: *Development*, v. 135, p. 849-57.

- Chen, E. H., 2011, Invasive podosomes and myoblast fusion: *Curr Top Membr*, v. 68, p. 235-58.
- Chen, E. H., and B. S. Baker, 1997, Compartmental organization of the *Drosophila* genital imaginal discs: *Development*, v. 124, p. 205-18.
- Chen, E. H., and E. N. Olson, 2001, Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*: *Dev Cell*, v. 1, p. 705-15.
- Chen, E. H., B. A. Pryce, J. A. Tzeng, G. A. Gonzalez, and E. N. Olson, 2003, Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6: *Cell*, v. 114, p. 751-62.
- Christiansen, A. E., E. L. Keisman, S. M. Ahmad, and B. S. Baker, 2002, Sex comes in from the cold: the integration of sex and pattern: *Trends Genet*, v. 18, p. 510-6.
- Clermont, Y., 1958, Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat: *Exp Cell Res*, v. 15, p. 438-40.
- Coles, C. H., and F. Bradke, 2015, Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics: *Curr Biol*, v. 25, p. R677-91.
- Conejo, M., M. Bertin, S. A. Pomponi, and W. R. Ellington, 2008, The early evolution of the phosphagen kinases--insights from choanoflagellate and poriferan arginine kinases: *J Mol Evol*, v. 66, p. 11-20.
- Cox, V. T., K. Beckett, and M. K. Baylies, 2005, Delivery of wingless to the ventral mesoderm by the developing central nervous system ensures proper patterning of individual slouch-positive muscle progenitors: *Dev Biol*, v. 287, p. 403-15.
- Cunha, P. M., T. Sandmann, E. H. Gustafson, L. Ciglar, M. P. Eichenlaub, and E. E. Furlong, 2010, Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses: Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity: *PLoS Genet*, v. 6, p. e1001014.
- Currie, D. A., and M. Bate, 1991, The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves: *Development*, v. 113, p. 91-102.
- de Joussineau, C., L. Bataille, T. Jagla, and K. Jagla, 2012, Diversification of muscle types in *Drosophila*: upstream and downstream of identity genes: *Curr Top Dev Biol*, v. 98, p. 277-301.
- DeFalco, T., N. Camara, S. Le Bras, and M. Van Doren, 2008, Nonautonomous sex determination controls sexually dimorphic development of the *Drosophila* gonad: *Dev Cell*, v. 14, p. 275-86.
- Deng, S., I. Bothe, and M. K. Baylies, 2015, The Formin Diaphanous Regulates Myoblast Fusion through Actin Polymerization and Arp2/3 Regulation: *PLoS Genet*, v. 11, p. e1005381.
- Dhanyasi, N., D. Segal, E. Shimoni, V. Shinder, B. Z. Shilo, K. VijayRaghavan, and E. D. Schejter, 2015, Surface apposition and multiple cell contacts promote myoblast fusion in *Drosophila* flight muscles: *J Cell Biol*, v. 211, p. 191-203.
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oettel, S. Scheibla, A. Couto, V. Marra, K. Keleman, and B. J. Dickson, 2007, A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*: *Nature*, v. 448, p. 151-6.
- Doberstein, S., R. Fetter, A. Mehta, and C. Goodman, 1997, Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex.: *J Cell Biol*, v. 136, p. 1249-61.
- Dobi, K. C., V. K. Schulman, and M. K. Baylies, 2015, Specification of the somatic musculature in *Drosophila*: *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, v. 4, p. 357-75.

- Dohrmann, C., N. Azpiazu, and M. Frasch, 1990, A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis: *Genes Dev*, v. 4, p. 2098-111.
- Dottermusch-Heidel, C., V. Groth, L. Beck, and S. F. Önel, 2012, The Arf-GEF Schizo/Loner regulates N-cadherin to induce fusion competence of *Drosophila* myoblasts: *Dev Biol*, v. 368, p. 18-27.
- Duan, H., J. B. Skeath, and H. T. Nguyen, 2001, *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development: *Development*, v. 128, p. 4489-500.
- Duan, R., P. Jin, F. Luo, G. Zhang, N. Anderson, and E. H. Chen, 2012, Group I PAKs function downstream of Rac to promote podosome invasion during myoblast fusion in vivo: *J Cell Biol*, v. 199, p. 169-85.
- Dutta, D., S. Anant, M. Ruiz-Gomez, M. Bate, and K. VijayRaghavan, 2004, Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*: *Development*, v. 131, p. 3761-72.
- Dworak, H. A., M. A. Charles, L. B. Pellerano, and H. Sink, 2001, Characterization of *Drosophila* *hibris*, a gene related to human nephrin: *Development*, v. 128, p. 4265-76.
- Dzeja, P. P., and A. Terzic, 2003, Phosphotransfer networks and cellular energetics: *J Exp Biol*, v. 206, p. 2039-47.
- Ellington, W. R., 2001, Evolution and physiological roles of phosphagen systems: *Annu Rev Physiol*, v. 63, p. 289-325.
- Ennor, A. H., and J. F. Morrison, 1958, Biochemistry of the phosphagens and related guanidines: *Physiol Rev*, v. 38, p. 631-74.
- Enriquez, J., H. Boukhatmi, L. Dubois, A. A. Philippakis, M. L. Bulyk, A. M. Michelson, M. Crozatier, and A. Vincent, 2010, Multi-step control of muscle diversity by Hox proteins in the *Drosophila* embryo: *Development*, v. 137, p. 457-66.
- Eppenberger, H. M., D. M. Dawson, and N. O. Kaplan, 1967, The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues: *J Biol Chem*, v. 242, p. 204-9.
- Estrada, B., F. Casares, and E. Sanchez-Herrero, 2003, Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*: *Differentiation*, v. 71, p. 299-310.
- Estrada, B., S. Choe, S. Gisselbrecht, S. Michaud, L. Raj, B. Busser, M. Halfon, G. Church, and A. Michelson, 2006, An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes.: *PLoS Genet*, v. 2, p. e16.
- Estrada, B., A. Maeland, S. Gisselbrecht, J. Bloor, N. Brown, and A. Michelson, 2007, The MARVEL domain protein, *Singles Bar*, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion.: *Dev Biol*, v. 307, p. 328-39.
- Fender, S., 2016, Charakterisierung von Wnt, MAPK und FGF Signalwegen während der Migration naszierender Myotuben auf die Testes von *Drosophila*, Philipps-Universität Marburg.
- Fernandes, J., M. Bate, and K. Vijayraghavan, 1991, Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*: *Development*, v. 113, p. 67-77.
- Figeac, N., M. Daczewska, C. Marcelle, and K. Jagla, 2007, Muscle stem cells and model systems for their investigation: *Dev Dyn*, v. 236, p. 3332-42.
- Fischbach, K. F., G. A. Linneweber, T. F. Andlauer, A. Hertenstein, B. Bonengel, and K. Chaudhary, 2009, The irre cell recognition module (IRM) proteins: *J Neurogenet*, v. 23, p. 48-67.

- Foe, V. E., G. M. Odell, and B. A. Edgar, 1993, Mitosis and Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo: Point and Counterpoint, in M. Bate, and A. Martinez-Arias, eds., *The Development of Drosophila melanogaster* Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press., p. 149-300.
- Folker, E. S., V. K. Schulman, and M. K. Baylies, 2012, Muscle length and myonuclear position are independently regulated by distinct Dynein pathways: *Development*, v. 139, p. 3827-37.
- Folker, E. S., V. K. Schulman, and M. K. Baylies, 2014, Translocating myonuclei have distinct leading and lagging edges that require kinesin and dynein: *Development*, v. 141, p. 355-66.
- Fraga, D., M. Aryal, J. E. Hall, E. Rae, and M. Snider, 2015, Characterization of the arginine kinase isoforms in *Caenorhabditis elegans*: *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 187, p. 85-101.
- Frasch, M., 1995, Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo: *Nature*, v. 374, p. 464-7.
- Fritzen, K., 2017, Die Entwicklung der mehrkernigen, glatten Muskeln von *Drosophila melanogaster* - Die Fusion der Testes-relevanten Myoblasten ist abhängig von Arp2/3-gesteuerter Aktin-Polymerisation, Philipps-Universität Marburg.
- Fuller, M., 1993, Spermiogenesis, in M. Bate, and A. Martinez-Arias, eds., *The Development of Drosophila melanogaster*: Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press., p. 71-147.
- Furlong, E., E. Andersen, B. Null, K. White, and M. Scott, 2001, Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development.: *Science*, v. 293, p. 1629-33.
- Galletta, B. J., X. P. Niu, M. R. Erickson, and S. M. Abmayr, 1999, Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC: *Gene*, v. 228, p. 243-52.
- Geisbrecht, E. R., S. Haralalka, S. K. Swanson, L. Florens, M. P. Washburn, and S. M. Abmayr, 2008, *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization: *Dev Biol*, v. 314, p. 137-49.
- Gentric, G., and C. Desdouets, 2014, Polyploidization in liver tissue: *Am J Pathol*, v. 184, p. 322-31.
- Ghazi, A., S. Anant, and K. VijayRaghavan, 2000, Apterous mediates development of direct flight muscles autonomously and indirect flight muscles through epidermal cues: *Development*, v. 127, p. 5309-18.
- Gildor, B., R. Massarwa, B. Shilo, and E. Schejter, 2009, The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion.: *EMBO Rep*, v. 10, p. 1043-50.
- Gildor, B., E. D. Schejter, and B. Z. Shilo, 2012, Bidirectional Notch activation represses fusion competence in swarming adult *Drosophila* myoblasts: *Development*, v. 139, p. 4040-50.
- Gärtner, S. M., C. Rathke, R. Renkawitz-Pohl, and S. Awe, 2014, Ex vivo culture of *Drosophila* pupal testis and single male germ-line cysts: dissection, imaging, and pharmacological treatment: *J Vis Exp*, p. 51868.
- Hakeda-Suzuki, S., J. Ng, J. Tzu, G. Dietzl, Y. Sun, M. Harms, T. Nardine, L. Luo, and B. J. Dickson, 2002, Rac function and regulation during *Drosophila* development: *Nature*, v. 416, p. 438-42.

- Hamp, J., A. Lower, C. Dottermusch-Heidel, L. Beck, B. Moussian, M. Flotenmeyer, and S. F. Onel, 2016, *Drosophila* Kette coordinates myoblast junction dissolution and the ratio of Scar-to-WASp during myoblast fusion: *J Cell Sci*, v. 129, p. 3426-36.
- Haralalka, S., C. Shelton, H. N. Cartwright, E. Katzfey, E. Janzen, and S. M. Abmayr, 2011, Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in *Drosophila*: *Development*, v. 138, p. 1551-62.
- Hornbruch-Freitag, C., B. Griemert, D. Buttgereit, and R. Renkawitz-Pohl, 2011, *Drosophila* Swiprosin-1/EFHD2 accumulates at the prefusion complex stage during *Drosophila* myoblast fusion: *J Cell Sci*, v. 124, p. 3266-78.
- Hrdlicka, L., M. Gibson, A. Kiger, C. Micchelli, M. Schober, F. Schöck, and N. Perrimon, 2002, Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*: *genesis*, v. 34, p. 51-57.
- Hudson, A. M., L. N. Petrella, A. J. Tanaka, and L. Cooley, 2008, Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps: *Dev Biol*, v. 314, p. 329-40.
- Jagla, T., Y. Bidet, J. P. Da Ponte, B. Dastugue, and K. Jagla, 2002, Cross-repressive interactions of identity genes are essential for proper specification of cardiac and muscular fates in *Drosophila*: *Development*, v. 129, p. 1037-47.
- Jin, P., R. Duan, F. Luo, G. Zhang, S. N. Hong, and E. H. Chen, 2011, Competition between Blown Fuse and WASP for WIP Binding Regulates the Dynamics of WASP-Dependent Actin Polymerization In Vivo: *Dev Cell*, v. 20, p. 623-38.
- Kaipa, B. R., H. Shao, G. Schäfer, T. Trinkewitz, V. Groth, J. Liu, L. Beck, S. M. Abmayr, and S. F. Onel, 2012, Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts: *J Cell Sci*.
- Kamimura, K., K. Ueno, J. Nakagawa, R. Hamada, M. Saitoe, and N. Maeda, 2013, Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction: *J Cell Biol*, v. 200, p. 219-33.
- Kesper, D., C. Stute, D. Buttgereit, N. Kreisköther, S. Vishnu, K. Fischbach, and R. Renkawitz-Pohl, 2007, Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn*, v. 236, p. 404-15.
- Kim, J. H., P. Jin, R. Duan, and E. H. Chen, 2015, Mechanisms of myoblast fusion during muscle development: *Curr Opin Genet Dev*, v. 32, p. 162-70.
- Kim, S., K. Shilagardi, S. Zhang, S. Hong, K. Sens, J. Bo, G. Gonzalez, and E. Chen, 2007, A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion.: *Dev Cell*, v. 12, p. 571-86.
- Klapper, R., C. Stute, O. Schomaker, T. Strasser, W. Janning, R. Renkawitz-Pohl, and A. Holz, 2002, The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on duf, sns and mbc: *Mech Dev*, v. 110, p. 85-96.
- Knirr, S., N. Azpiazu, and M. Frasch, 1999, The role of the NK-homeobox gene slouch (S59) in somatic muscle patterning: *Development*, v. 126, p. 4525-35.
- Knirr, S., and M. Frasch, 2001, Molecular integration of inductive and mesoderm-intrinsic inputs governs even-skipped enhancer activity in a subset of pericardial and dorsal muscle progenitors: *Dev Biol*, v. 238, p. 13-26.
- Kocherlakota, K. S., J. M. Wu, J. McDermott, and S. M. Abmayr, 2008, Analysis of the cell adhesion molecule sticks-and-stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*: *Genetics*, v. 178, p. 1371-83.

- Kozopas, K. M., and R. Nusse, 2002, Direct flight muscles in *Drosophila* develop from cells with characteristics of founders and depend on DWnt-2 for their correct patterning: *Dev Biol*, v. 243, p. 312-25.
- Kozopas, K. M., C. H. Samos, and R. Nusse, 1998, DWnt-2, a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate: *Genes Dev*, v. 12, p. 1155-65.
- Kuckwa, J., 2010, Die adulte abdominale Muskulatur als neues System der Myogenese sowie die Analyse von Ribokinase33E als mögliche neue Komponente der embryonalen Myoblastenfusion, Philipps-Universität Marburg.
- Kuckwa, J., K. Fritzen, D. Buttgerit, S. Rothenbusch-Fender, and R. Renkawitz-Pohl, 2016, A new level of plasticity: *Drosophila* smooth-like testes muscles compensate failure of myoblast fusion: *Development*, v. 143, p. 329-38.
- Kuiper, J. W., H. Pluk, F. Oerlemans, F. N. van Leeuwen, F. de Lange, J. Fransen, and B. Wieringa, 2008, Creatine kinase-mediated ATP supply fuels actin-based events in phagocytosis: *PLoS Biol*, v. 6, p. e51.
- Lacroix, B., and A. S. Maddox, 2012, Cytokinesis, ploidy and aneuploidy: *J Pathol*, v. 226, p. 338-51.
- Lecuyer, E., N. Parthasarathy, and H. M. Krause, 2008, Fluorescent in situ hybridization protocols in *Drosophila* embryos and tissues: *Methods Mol Biol*, v. 420, p. 289-302.
- Leiss, D., U. Hinz, A. Gasch, R. Mertz, and R. Renkawitz-Pohl, 1988, Beta 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis.: *Development*, v. 104, p. 525-31.
- Leptin, M., 1991, twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development: *Genes Dev*, v. 5, p. 1568-76.
- Li, F., X. Wang, J. M. Capasso, and A. M. Gerdes, 1996, Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development: *J Mol Cell Cardiol*, v. 28, p. 1737-46.
- Lilly, B., S. Galewsky, A. B. Firulli, R. A. Schulz, and E. N. Olson, 1994, D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 5662-6.
- Linnemannstöns, K., C. Ripp, M. Honemann-Capito, K. Brechtel-Curth, M. Hedderich, and A. Wodarz, 2014, The PTK7-related transmembrane proteins off-track and off-track 2 are co-receptors for *Drosophila* Wnt2 required for male fertility: *PLoS Genet*, v. 10, p. e1004443.
- Liu, Z., S. Yue, X. Chen, T. Kubin, and T. Braun, 2010, Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1: *Circ Res*, v. 106, p. 1498-506.
- Luo, L., Y. J. Liao, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, 1994, Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion: *Genes Dev*, v. 8, p. 1787-802.
- Mahajan, V. B., K. S. Pai, A. Lau, and D. D. Cunningham, 2000, Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 12062-7.
- Maqbool, T., and K. Jagla, 2007, Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*: *J Muscle Res Cell Motil*, v. 28, p. 397-407.
- Maqbool, T., C. Soler, T. Jagla, M. Daczewska, N. Lodha, S. Palliyil, K. VijayRaghavan, and K. Jagla, 2006, Shaping leg muscles in *Drosophila*: role of ladybird, a conserved regulator of appendicular myogenesis: *PLoS One*, v. 1, p. e122.

- Martens, S., and H. T. McMahon, 2008, Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 543-56.
- Martin, B. S., M. Ruiz-Gomez, M. Landgraf, and M. Bate, 2001, A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo: *Development*, v. 128, p. 3331-8.
- Massarwa, R., S. Carmon, B. Shilo, and E. Schejter, 2007, WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*: *Dev Cell*, v. 12, p. 557-69.
- Matsumoto, T., and K. Nagayama, 2012, Tensile properties of vascular smooth muscle cells: bridging vascular and cellular biomechanics: *J Biomech*, v. 45, p. 745-55.
- Mayerhofer, A., 2013, Human testicular peritubular cells: more than meets the eye: *Reproduction*, v. 145, p. R107-16.
- McGuire, S. E., Z. Mao, and R. L. Davis, 2004, Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*: *Sci STKE*, v. 2004, p. pl6.
- Menon, S. D., and W. Chia, 2001, *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded: *Dev Cell*, v. 1, p. 691-703.
- Menon, S. D., Z. Osman, K. Chenchill, and W. Chia, 2005, A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*: *J Cell Biol*, v. 169, p. 909-20.
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E. S. Folker, B. E. Richardson, E. R. Gomes, and M. K. Baylies, 2012, MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function: *Nature*, v. 484, p. 120-4.
- Middleton, C. A., U. Nongthomba, K. Parry, S. T. Sweeney, J. C. Sparrow, and C. J. Elliott, 2006, Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary: *BMC Biol*, v. 4, p. 17.
- Morin, X., R. Daneman, M. Zavortink, and W. Chia, 2001, A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 15050-5.
- Muhlebach, S. M., M. Gross, T. Wirz, T. Wallimann, J. C. Perriard, and M. Wyss, 1994, Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes: *Mol Cell Biochem*, v. 133-134, p. 245-62.
- Mukherjee, P., B. Gildor, B. Z. Shilo, K. VijayRaghavan, and E. D. Schejter, 2011, The actin nucleator WASp is required for myoblast fusion during adult *Drosophila* myogenesis: *Development*, v. 138, p. 2347-57.
- Nanda, S., T. J. DeFalco, S. H. Loh, N. Phochanukul, N. Camara, M. Van Doren, and S. Russell, 2009, Sox100B, a *Drosophila* group E Sox-domain gene, is required for somatic testis differentiation: *Sex Dev*, v. 3, p. 26-37.
- Nguyen, H. T., R. Bodmer, S. M. Abmayr, J. C. McDermott, and N. A. Spoerel, 1994, D-mef2: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 7520-4.
- Nolan, K. M., K. Barrett, Y. Lu, K. Q. Hu, S. Vincent, and J. Settleman, 1998, Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes: *Genes Dev*, v. 12, p. 3337-42.
- Nose, A., T. Isshiki, and M. Takeichi, 1998, Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene: *Development*, v. 125, p. 215-23.

- O'Connor, R. S., C. M. Steeds, R. W. Wiseman, and G. K. Pavlath, 2008, Phosphocreatine as an energy source for actin cytoskeletal rearrangements during myoblast fusion: *J Physiol*, v. 586, p. 2841-53.
- Önel, S.-F., C. Dottermusch, A. Sickmann, D. Buttgerit, and R. Renkawitz-Pohl, 2011, Role of the Actin Cytoskeleton Within FuRMAS During *Drosophila* Myoblast Fusion and First Functionally Conserved Factors in Vertebrates, *in* I. Larsson, ed., *Cell Fusions: Regulation and Control.*, Springer.
- Önel, S.-F., and R. Renkawitz-Pohl, 2009, FuRMAS: triggering myoblast fusion in *Drosophila*.: *Dev Dyn*, v. 238, p. 1513-25.
- Önel, S.-F., M. B. Rust, R. Jacob, and R. Renkawitz-Pohl, 2014, Tethering membrane fusion: common and different players in myoblasts and at the synapse: *J Neurogenet*, v. 28, p. 302-15.
- Palombi, F., D. Farini, M. Salanova, S. de Grossi, and M. Stefanini, 1992, Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis: *Anat Rec*, v. 233, p. 32-40.
- Park, M., L. E. Yaich, and R. Bodmer, 1998, Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *Notch*, and *sanpodo*: *Mech Dev*, v. 75, p. 117-26.
- Powell, G. T., and G. J. Wright, 2011, *Jamb* and *jamc* are essential for vertebrate myocyte fusion, *PLoS Biol*, v. 9: United States, p. e1001216.
- Quinones-Coello, A. T., L. N. Petrella, K. Ayers, A. Melillo, S. Mazzalupo, A. M. Hudson, S. Wang, C. Castiblanco, M. Buszczak, R. A. Hoskins, and L. Cooley, 2007, Exploring strategies for protein trapping in *Drosophila*: *Genetics*, v. 175, p. 1089-104.
- Ramos, R. G., G. L. Igloi, B. Lichte, U. Baumann, D. Maier, T. Schneider, J. H. Brandstatter, A. Frohlich, and K. F. Fischbach, 1993, The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein: *Genes Dev*, v. 7, p. 2533-47.
- Ranganayakulu, G., B. Zhao, A. Dokidis, J. D. Molkentin, E. N. Olson, and R. A. Schulz, 1995, A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*: *Dev Biol*, v. 171, p. 169-81.
- Rau, A., D. Buttgerit, A. Holz, R. Fetter, S. Doberstein, A. Paululat, N. Staudt, J. Skeath, A. Michelson, and R. Renkawitz-Pohl, 2001, rolling pebbles (*rols*) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion.: *Development*, v. 128, p. 5061-73.
- Reim, I., H.-H. Lee, and M. Frasch, 2003, The T-box-encoding *Dorsocross* genes function in *amnioserosa* development and the patterning of the dorsolateral germ band downstream of *Dpp*.
- Reiter, C., T. Schimansky, Z. Nie, and K. F. Fischbach, 1996, Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the *IrreC-rst* protein: *Development*, v. 122, p. 1931-40.
- Richardson, B. E., K. Beckett, S. J. Nowak, and M. K. Baylies, 2007, SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion: *Development*, v. 134, p. 4357-67.
- Richardson, B. E., S. J. Nowak, and M. K. Baylies, 2008, Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives: *Traffic*, v. 9, p. 1050-9.
- Riechmann, V., U. Irion, R. Wilson, R. Grosskortenhaus, and M. Leptin, 1997, Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm: *Development*, v. 124, p. 2915-22.

- Riedl, J., A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner, 2008, Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin: *Nat Methods*, v. 5, p. 605-7.
- Rochlin, K., S. Yu, S. Roy, and M. Baylies, 2010, Myoblast fusion: when it takes more to make one.: *Dev Biol*, v. 341, p. 66-83.
- Ross, M. H., 1967, The fine structure and development of the peritubular contractile cell component in the seminiferous tubules of the mouse: *Am J Anat*, v. 121, p. 523-57.
- Roy, S., and K. VijayRaghavan, 1997, Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in *Drosophila*: *Development*, v. 124, p. 3333-41.
- Roy, S., and K. VijayRaghavan, 1999, Muscle pattern diversification in *Drosophila*: the story of imaginal myogenesis: *Bioessays*, v. 21, p. 486-98.
- Rudolf, A., D. Buttgereit, M. Jacobs, G. Wolfstetter, D. Kesper, M. Putz, S. Berger, R. Renkawitz-Pohl, A. Holz, and S. F. Onel, 2014, Distinct genetic programs guide *Drosophila* circular and longitudinal visceral myoblast fusion: *BMC Cell Biol*, v. 15, p. 27.
- Rudolf, A., D. Buttgereit, K. H. Rexer, and R. Renkawitz-Pohl, 2012, The syncytial visceral and somatic musculature develops independently of $\beta 3$ -Tubulin during *Drosophila* embryogenesis, while maternally supplied $\beta 1$ -Tubulin is stable until the early steps of myoblast fusion: *Eur J Cell Biol*, v. 91, p. 192-203.
- Ruiz Gomez, M., and M. Bate, 1997, Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb: *Development*, v. 124, p. 4857-66.
- Ruiz-Gomez, M., N. Coutts, M. L. Suster, M. Landgraf, and M. Bate, 2002, myoblasts incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*: *Development*, v. 129, p. 133-41.
- Ruiz-Gómez, M., N. Coutts, A. Price, M. Taylor, and M. Bate, 2000, *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion.: *Cell*, v. 102, p. 189-98.
- Rushton, E., R. Drysdale, S. M. Abmayr, A. M. Michelson, and M. Bate, 1995, Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development: *Development*, v. 121, p. 1979-88.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase: *Science*, v. 239, p. 487-91.
- Saks, V., T. Kaambre, R. Guzun, T. Anmann, P. Sikk, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Aliev, and M. Vendelin, 2007, The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches: *Subcell Biochem*, v. 46, p. 27-65.
- Sandmann, T., C. Girardot, M. Brehme, W. Tongprasit, V. Stolc, and E. E. Furlong, 2007, A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*: *Genes Dev*, v. 21, p. 436-49.
- Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, and T. Wallimann, 2006, Mitochondrial creatine kinase in human health and disease: *Biochim Biophys Acta*, v. 1762, p. 164-80.
- Schneider, I., 1972, Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*: *J Embryol Exp Morphol*, v. 27, p. 353-65.
- Schröter, R., D. Buttgereit, L. Beck, A. Holz, and R. Renkawitz-Pohl, 2006, Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *Drosophila*.: *Differentiation*, v. 74, p. 608-21.

- Schröter, R., S. Lier, A. Holz, S. Bogdan, C. Klämbt, L. Beck, and R. Renkawitz-Pohl, 2004, *kette* and *blown* fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*.: *Development*, v. 131, p. 4501-9.
- Schulman, V. K., K. C. Dobi, and M. K. Baylies, 2015, Morphogenesis of the somatic musculature in *Drosophila melanogaster*: *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, v. 4, p. 313-34.
- Schulman, V. K., E. S. Folker, J. N. Rosen, and M. K. Baylies, 2014, Syd/JIP3 and JNK signaling are required for myonuclear positioning and muscle function: *PLoS Genet*, v. 10, p. e1004880.
- Schäfer, G., S. Weber, A. Holz, S. Bogdan, S. Schumacher, A. Müller, R. Renkawitz-Pohl, and S. Onel, 2007, The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*.: *Dev Biol*, v. 304, p. 664-74.
- Segal, D., N. Dhanyasi, E. D. Schejter, and B. Z. Shilo, 2016, Adhesion and Fusion of Muscle Cells Are Promoted by Filopodia: *Dev Cell*, v. 38, p. 291-304.
- Sens, K. L., S. Zhang, P. Jin, R. Duan, G. Zhang, F. Luo, L. Parachini, and E. H. Chen, 2010, An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion: *J Cell Biol*, v. 191, p. 1013-27.
- Shelton, C., K. Kocherlakota, S. Zhuang, and S. Abmayr, 2009, The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts.: *Development*, v. 136, p. 1159-68.
- Shilagardi, K., S. Li, F. Luo, F. Marikar, R. Duan, P. Jin, J. H. Kim, K. Murnen, and E. H. Chen, 2013, Actin-propelled invasive membrane protrusions promote fusogenic protein engagement during cell-cell fusion: *Science*, v. 340, p. 359-63.
- Soler, C., M. Daczewska, J. P. Da Ponte, B. Dastugue, and K. Jagla, 2004, Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg: *Development*, v. 131, p. 6041-51.
- Staehling-Hampton, K., F. M. Hoffmann, M. K. Baylies, E. Rushton, and M. Bate, 1994, *dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*: *Nature*, v. 372, p. 783-6.
- Stern, C., 1941a, The growth of testes in *Drosophila*. I. The relation between vas deferens and testis within various species: *Journal of Experimental Zoology*, v. 87, p. 113-158.
- Stern, C., 1941b, The growth of the testes in *Drosophila*. II. The nature of interspecific differences.: *Journal of Experimental Zoology*, v. 87, p. 159-180.
- Stern, C., and E. Hadorn, 1939, The Relation between the Color of Testes and Vasa Efferentia in *Drosophila*: *Genetics*, v. 24, p. 162-79.
- Strong, S. J., and W. R. Ellington, 1995, Isolation and sequence analysis of the gene for arginine kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus polyphemus*: insights into catalytically important residues: *Biochim Biophys Acta*, v. 1246, p. 197-200.
- Strükelberg, M., B. Bonengel, L. Moda, A. Hertenstein, H. de Couet, R. Ramos, and K. Fischbach, 2001, *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*.: *Development*, v. 128, p. 4229-39.
- Stute, C., D. Kesper, A. Holz, D. Buttgereit, and R. Renkawitz-Pohl, 2006, Establishment of cell type specific Gal4-driver lines for the mesoderm of *Drosophila*.: *Dros Inf Serf*, v. 89, p. 111-5.
- Susic-Jung, L., C. Hornbruch-Freitag, J. Kuckwa, K. H. Rexer, U. Lammel, and R. Renkawitz-Pohl, 2012, Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of *Drosophila melanogaster*: *Dev Biol*, v. 370, p. 86-97.
- Takenawa, T., and S. Suetsugu, 2007, The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, p. 37-48.

- Taniguchi, K., A. Kokuryo, T. Imano, R. Minami, H. Nakagoshi, and T. Adachi-Yamada, 2014, Isoform-specific functions of Mud/NuMA mediate binucleation of *Drosophila* male accessory gland cells: *BMC Dev Biol*, v. 14, p. 46.
- Taylor, M. V., K. E. Beatty, H. K. Hunter, and M. K. Baylies, 1995, *Drosophila* MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature: *Mech Dev*, v. 50, p. 29-41.
- Thisse, B., M. el Messal, and F. Perrin-Schmitt, 1987, The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern: *Nucleic Acids Res*, v. 15, p. 3439-53.
- Tixier, V., L. Bataille, and K. Jagla, 2010, Diversification of muscle types: recent insights from *Drosophila*: *Exp Cell Res*, v. 316, p. 3019-27.
- Tylkova, L., 2009, Architectural and functional remodeling of cardiac and skeletal muscle cells in mice lacking specific isoenzymes of creatine kinase: *Gen Physiol Biophys*, v. 28, p. 219-24.
- Uda, K., N. Fujimoto, Y. Akiyama, K. Mizuta, K. Tanaka, W. R. Ellington, and T. Suzuki, 2006, Evolution of the arginine kinase gene family: *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, v. 1, p. 209-18.
- Wallimann, T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, and H. M. Eppenberger, 1992, Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis: *Biochem J*, v. 281 (Pt 1), p. 21-40.
- Weavers, H., S. Prieto-Sanchez, F. Grawe, A. Garcia-Lopez, R. Artero, M. Wilsch-Brauninger, M. Ruiz-Gomez, H. Skaer, and B. Denholm, 2009, The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm: *Nature*, v. 457, p. 322-6.
- Welter, H., C. Kampfer, S. Lauf, R. Feil, J. U. Schwarzer, F. M. Kohn, and A. Mayerhofer, 2013, Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients: *Andrology*, v. 1, p. 318-24.
- White-Cooper, H., 2010, Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis: *Reproduction*, v. 139, p. 11-21.
- Wolfner, M. F., 2007, "S.P.E.R.M." (seminal proteins (are) essential reproductive modulators): the view from *Drosophila*: *Soc Reprod Fertil Suppl*, v. 65, p. 183-99.
- Wyss, M., and R. Kaddurah-Daouk, 2000, Creatine and creatinine metabolism: *Physiol Rev*, v. 80, p. 1107-213.
- Zallen, J. A., Y. Cohen, A. M. Hudson, L. Cooley, E. Wieschaus, and E. D. Schejter, 2002, SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*: *J Cell Biol*, v. 156, p. 689-701.
- Zeitlinger, J., R. P. Zinzen, A. Stark, M. Kellis, H. Zhang, R. A. Young, and M. Levine, 2007, Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo: *Genes Dev*, v. 21, p. 385-90.
- Zhuang, S., H. Shao, F. Guo, R. Trimble, E. Pearce, and S. M. Abmayr, 2009, Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Neph1 and Neph3, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes: *Development*, v. 136, p. 2335-44.

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adulte Muskelvorläuferzelle (adult muscle precursor)
APF	nach der Verpuppung (after puparium formation)
<i>argk</i>	<i>Argininkinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>blow</i>	<i>Blown fuse</i>
CK	Creatinkinase
de	Ductus ejaculatus
DLM	dorsale longitudinale Muskulatur/Muskeln
<i>dock</i>	<i>Dreadlock</i>
<i>DSwip-1</i>	<i>Drosophila Swiprosin 1</i>
<i>duf</i>	<i>dumbfounded</i>
DVM	dorsoventrale Thoraxmuskulatur
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
F-Aktin	filamentöses Aktin
FC	Gründerzelle (founder cell)
FCM	Fusionskompetente Myoblaste (fusion competent myoblast)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FISH	fluoreszente <i>in situ</i> -Hybridisierung
FuRMAS	fusion-restricted myogenic adhesive structure
GEF	Guanidin Austauschfaktor (guanidine exchange factor)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
<i>hbs</i>	<i>hibris</i>
IFM	indirekter Flugmuskeln
IgSF	Immunoglobulin Superfamilie
<i>mbc</i>	<i>myoblast city</i>
<i>mhcl</i>	<i>myosin heavy chain like</i>

<i>N-Cad</i>	<i>N-Cadherin</i>
NLS	Kernlokalisierungs-Signal (nuclear localization signal)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Paragonium
RNAi	RNA-Interferenz
<i>rols</i>	<i>rolling pebbles</i>
<i>rst</i>	<i>roughest</i>
<i>SCAR</i>	<i>Suppressor of cyclic AMP receptor</i>
<i>sing</i>	<i>singles bar</i>
<i>siz</i>	<i>schizo</i>
<i>sns</i>	<i>sticks and stones</i>
sp	Spermienpumpe
te	Testis
vs	Samenblase (seminal vesicle)
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein

8.2. Insertionsorte der Proteintrap-P-Elemente in der genomischen Region

8.2.1. *Trol* gene region: bp 26.901 bis bp 27.500

ACATTTTTTTTTCTTAGCTATGCCATCGAAACATTTTATTCGAGTTCACAGCATGCGCATAAACGTTGATTGTGTTGC
AAGTGAAAAAGTGAAAAGCTTGTTGCGCCGTTGTTGCTTCCGTTGGCACTGCTTCCTGGCTTCTATGCACAGCGTAGAGT
GTCAGCAATAAAGGTAACATAAGTTAACGAACCAATGTGTGAAAATTGGCTGCAAAATGTATAAAATTCGATTTAATT
TAAACCTTTGGCGCAAGCGCAGCATTTTCAAATTAGCCCGACGGCAGCAACATGTTGCGGGCAGAAAAAGGCGAACCTT
CGGCAGCATGTTGCTTTACCTGGTTGGTTGGCTGCTTGCAAATGCTCGGGTCCGTTCTGTTGCGGTTTTATACGTGT

Insertionsort L311

▼
GGTGCGCCCGGTGTCGTCATCTTCGGCCTTCGGCTTTTGTATTCGTGTTCCAGTTTTGCCATCAACATTTAAGGCCGCA
GCAATGTTGCCATTAGAGCATATTTCCACAGAATTAGTTATTTATATGAAAGGCAACCGAATAAAAAGAAAGTAA
GTGTAGAGTGGACTTCGTAACGTATTCAAATGTTTTGAAA

8.2.2. *Argk* gene region: bp 7601 bis bp 9000

GAAGCACCGACTGCAGTCAGTTGGGTAAAGAACAGAATATTCCGATCATTGTAACGTTGGACGTTGAATTCTACGGTTG
CAAAGGTGAGCCGTCCTCCAAAGATAATATTTAAAAATCAAGTGAAAATTCAGACGTTCAAGTATCTAACAGATACAGT
GTCGTTATCTTAGATTTTAATCTTTAATTTAACAGTTTTGTGGCACCCAAAAAATTAATGCAATCATTACGAAGTGAAT
TCTGGTTAAATTTAATTTCCAATTATATAAAGTGAACACTACTATTAGAATTAAATTTTCACGGGTTTGTGTGGCAAATGA

Insertionsort YB0338

▼
AAATCAAATTTTCGGCTTTTTAAACAGTGAACGCCTCCTTAATTGCAATAACTTTTTGAAAAGTTTGTAACATTTTTGC
GGTAATTAGCCAATAAATACAGTGAATGGCTTTTAGATTTGTACATTTAGTGGCCATTAAATGCTGTGCTCAGATTTTGA
ATAAAATTTTATTTACTTGGGCTTTTGCAAATATATGCCAAACCAATAGTGAATTCTTATACAATCGTAATGAAAAT
TATAGTTGCAGAAAATTAGTAAAATTAATTCATAATTAATAAATAAAGATTTTGAAAGCTAGCTATTTGTTTCAAGT
TGTATTTTATAGTAATTTTCATATGTTTTAAATTTATCCTTAATTTCTTAAGCCTCATGAATATTTCAAGTTATTTAATAT

Insertionsort ZCL0785

▼
TTTTTCTGTGCCGTGAGCTTGTGTTGAAGTTTTACATCCCCAGTTGAGTCATGCGATGCATTTTTGCAAGCCGAAACCG
GTTACCGGCGAGAAGAAATTTATACGGGCGGCTATGAGCTGTAAAGCTTTAAGTTTATAGTTATGCAGTTTCAGATTTTT
TTTTTTTTTGCATTTTGCCAGACAGACTGCAGAACTTGTGTTGGCCACCGCTGTCACGGTCTGGCAGCCGCTGACGAT
TCGTCCGTCCGTGAGTCTGATGCATTTTGTATACCATTTAGTTGTGCAATTTTTTTCGGGCCAAATGCCAATGAACGGAG
GACTGTACCGCTTGCCAAGTGCTGTGGATGGAGGGAGGGTGGGTAGGTTATAGCGGTATT

8.3. Alignment der potentiellen Argininkinasen von *Drosophila*

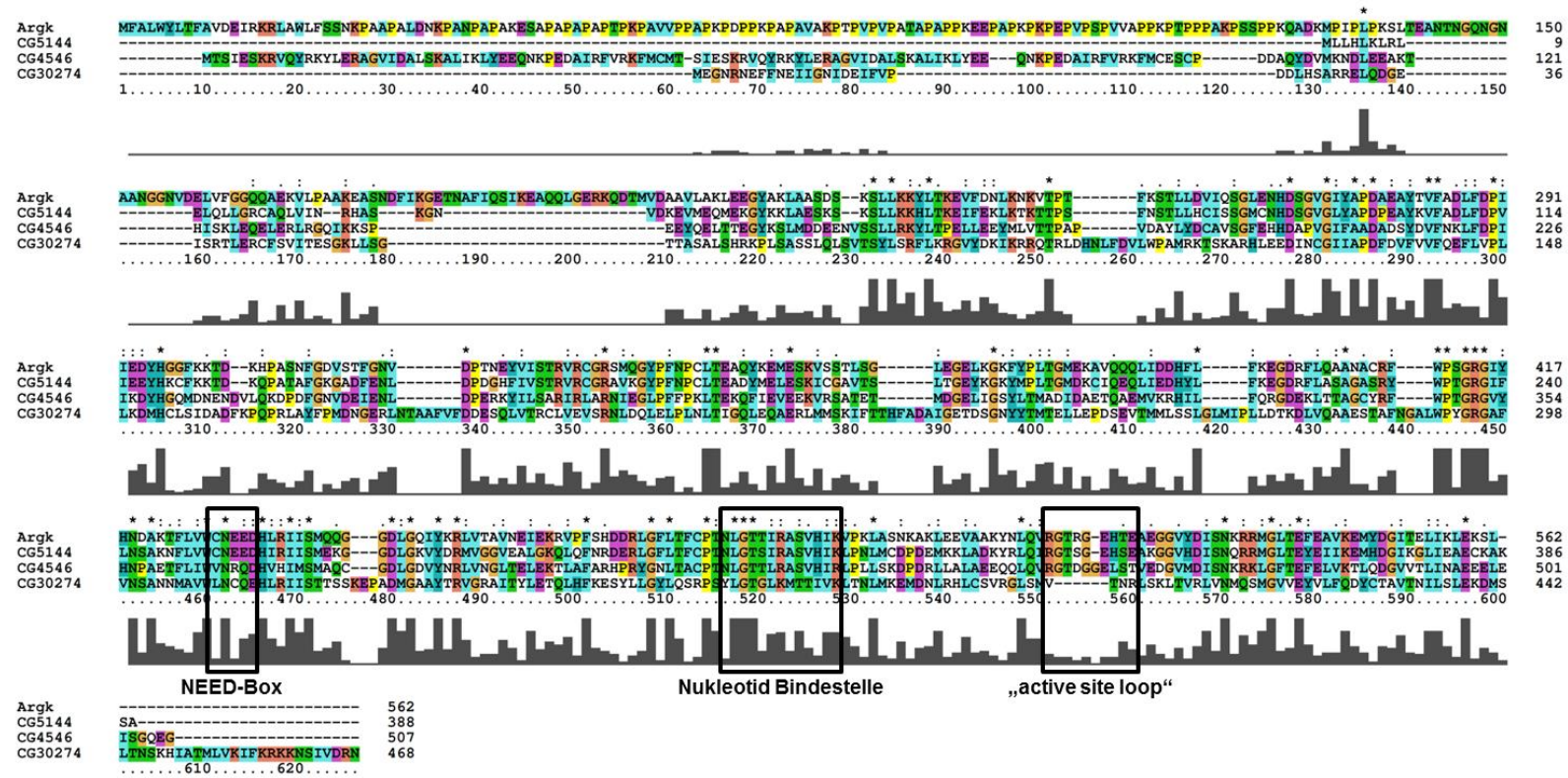


Abb. 31: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Drosophila* Argk, CG5144, CG4546 und CG30274

„Clustal 2.1 Multiple Sequence Alignment“ von Argk und weiterer potentieller Argininkinasen, die durch Blast-Suche mit Creatinkinase im *Drosophila*-Genom identifiziert wurden. Argk besitzt die größte Ähnlichkeit zu Creatinkinase. Schwarze Kästen markieren Bereiche, die für eine Funktion als Argininkinase essentiell sind: Need-Box (Cantwell et al., 2001), Adenin-Nukleotid Bindestelle (Muhlebach et al., 1994; Strong und Ellington, 1995) und „active site loop“ (Azzi et al., 2004; Cantwell et al., 2001). Ausschließlich Argk und CG5144 weisen das für die Kinase Funktion essentielle NEED-Motiv auf.

8.4. *Argk* ist das einzige während der embryonalen Myogenese spezifisch im somatischen und viszerale Mesoderm transkribierte Phosphagen-Gen im *Drosophila* Genom

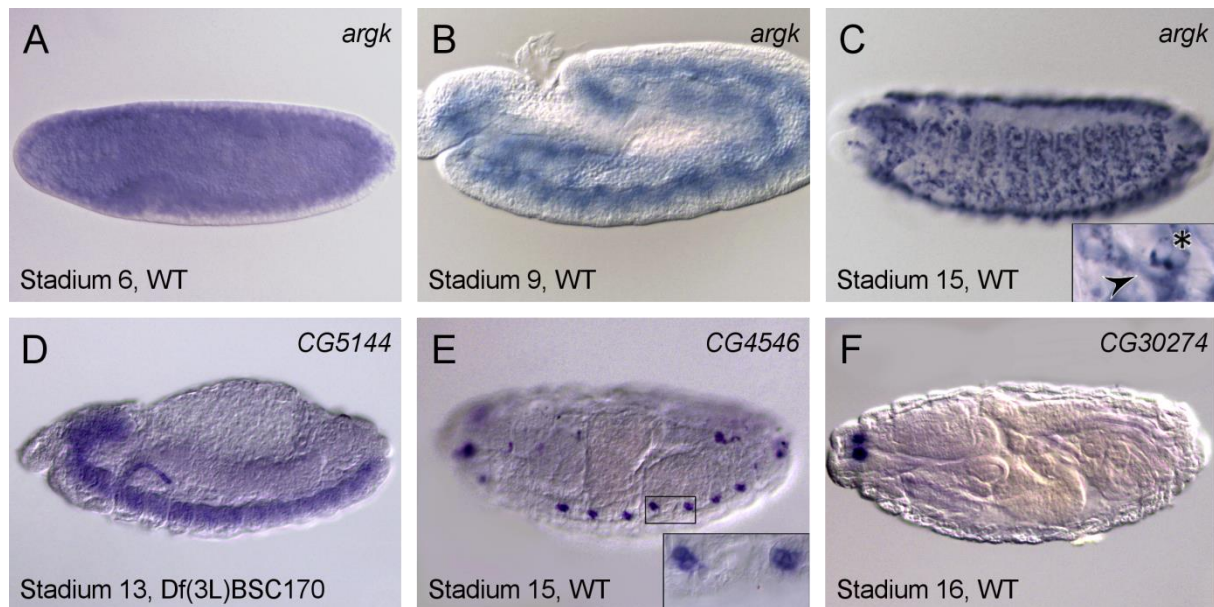


Abb. 32: *in situ*-Hybridisierungen mit antisense RNA-Sonden gegen *argk*, *CG5144*, *CG4546* und *CG30274*
Transkripte von *argk* sind in der frühen Embryonalentwicklung im Blastoderm (A) sowie im Mesoderm während des Keimstreifrückzugs (B) zu detektieren. In späteren Stadien (C) ist *argk* mRNA sowohl in den wachsenden Muskeln (Pfeilkopf im vergrößerten Ausschnitt) als auch in den FCMs (Sternchen im vergrößerten Ausschnitt) sichtbar (A-C aus Kuckwa, 2010). In wildtypischen Embryonen lässt sich mit RNA-Sonden gegen *CG5144* ein zu *argk* vergleichbares Signalmuster nachweisen (Kuckwa, 2010). Im Gegensatz zur wildtypischen Situation zeigt die antisense Sonde gegen *CG5144* in *argk*-defizienten Embryonen der Linie Df(3L)BSC170 ein Signal im ZNS (D). Detektion der *CG4546* mRNAs zeigen eine Färbung in den pentascolopedialen Bereichen der Chordotonalorgane (E). RNA-Sonden gegen *CG30274* zeigen ein Signal im Kopfbereich von Embryonen ab Stadium 16 (F).

8.5. Übersicht *argk*-defizienter Fliegenlinien

Tabelle 3: *argk*-defiziente Fliegenlinien darin und deletierte Gene

Genotyp	betroffene Gene (Attrill et al., 2016)	Defekt der Myoblastenfusion
Df(3L)BSC170/ Df(3L)BSC170	Argk , CG4911, CG4942, teq, CG32032, CG13315, bol, Dhpr, Use1, nwk, Rdl, mir-4940	nein
Df(3L)BSC130/ Df(3L)BSC130	ValRS-m, CG5653, CG5021, CG5026, pix, Srp68, CG5644, CG13314, Galk, CG5068, CG5280, smg, CG5087, Doc3, CG5194, Doc2, Doc1, CG5144 , Argk , CG4911, CG4942, teq, CG32032, CG13315, bol	nein
Df(3L)BSC170/ Df(3L)BSC130	Argk , CG4911, CG4942, teq, CG32032, CG13315, bol	nein

8.6. Benötigte Zeit für die pupale Entwicklung bei verschiedenen Umgebungstemperaturen

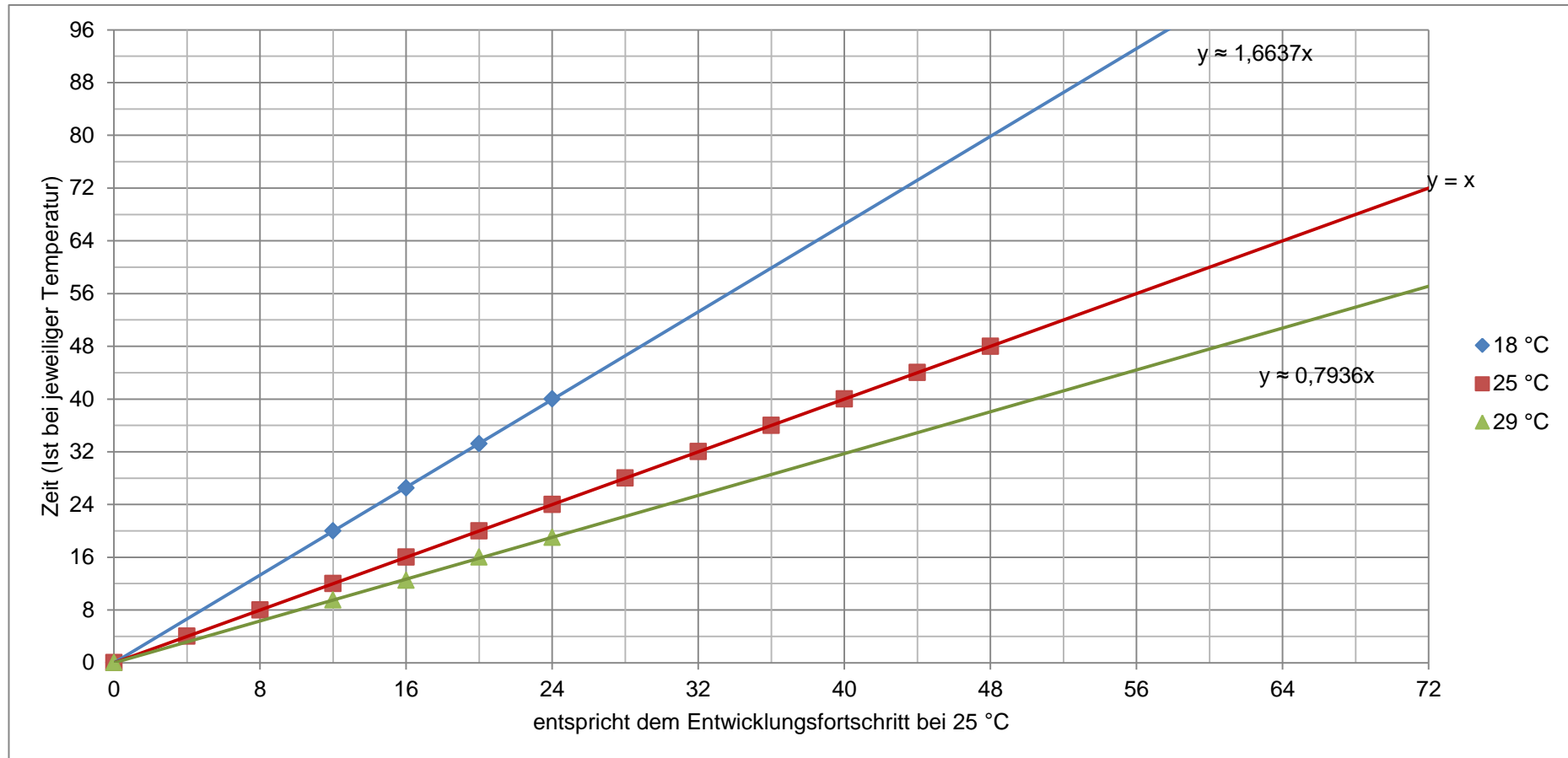


Abb. 33: Dauer und Fortschritt der pupalen Entwicklung bei verschiedenen Temperaturen

Das Voranschreiten der Entwicklung der *Drosophila* Puppe ist abhängig von der Umgebungstemperatur. Anhand der vorliegenden Graphik kann die schnellere Entwicklung bei 29 °C bzw. langsamere Entwicklung bei 18 °C (y-Achse) auf die in der Arbeit angegebenen Zeiten (x-Achse, Entwicklung bei 25 °C) umgerechnet werden (Datengrundlage: Atreya und Fernandes, 2008).

8.7. Expressionsmuster des Gal4-Treibers C855a

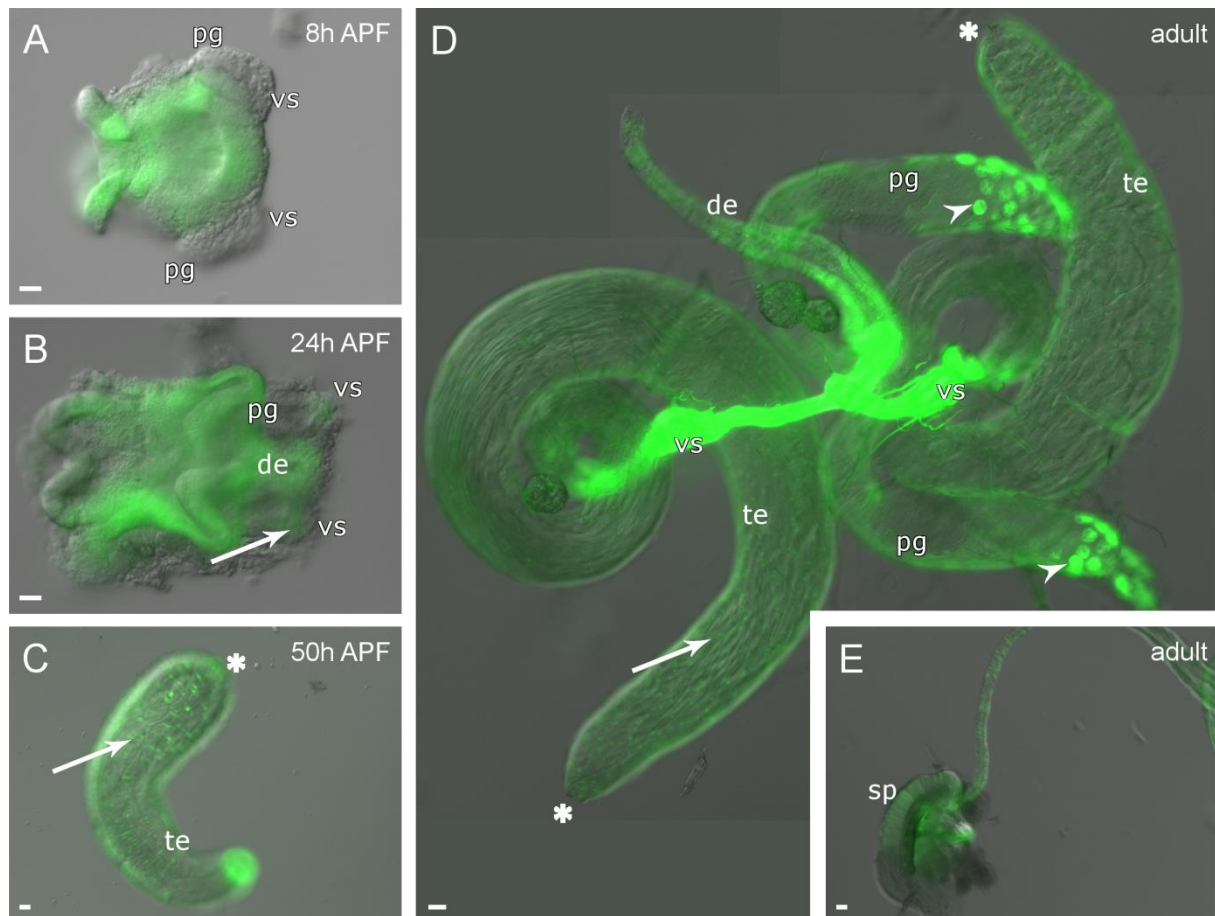


Abb. 34: Expression von C855a-Gal4 im Verlauf der Entstehung des männlichen Reproduktionstrakts

C855a-getriebenes UAS-GFP im männlichen Reproduktionstrakt zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung. GFP-Expression ist bereits 8 h APF im Epithel der Genitalscheibe erkennbar, die adephthelialen Myoblasten zeigen jedoch kein Signal (A). 24 h APF ist eine schwache Expression in den anterioren Spitzen der entstehenden Samenblasen zu erkennen (B, Pfeil). Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist der Treiber in naszierenden Myotuben auf dem Testis aktiv (C, Pfeil). Die GFP-Expression in der Testismuskelschicht ist auch noch im adulten Reproduktionssystem zu beobachten (Pfeil), wobei auch die sekretorischen „secondary cells“ (Pfeilkopf) ein deutliches GFP-Signal (D) zeigen. Adulte Spermienpumpenmuskeln zeigen keine GFP-Expression (E). te: Testis; vs: Samenblase; pg: Paragonium; de: Ductus ejaculatus; sp: Spermienpumpe; Sternchen: Hubregion; Maßstabsbalken: 20 µm

8.8. Trol ist in Genitalscheiben nachweisbar

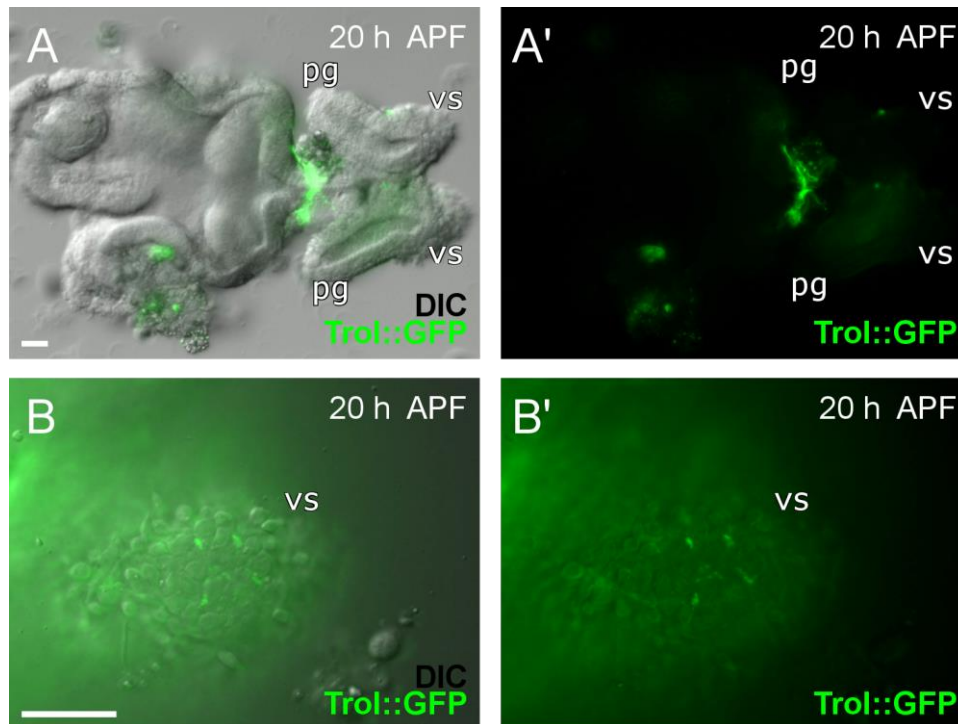


Abb. 35: Ein Trol::GFP Fusionprotein ist 20 h APF bereits exprimiert

In einer Trol::GFP exprimierenden Proteintrap-Linie (L311) ist ein GFP-Signal bereits 20 h APF auf der Genitalscheibe sichtbar (A und A'). Die Expression des Fusionsproteins ist dabei schwach auch in der entstehenden Samenblase detektierbar (B und B'). vs: Samenblase; pg: Paragonium. Maßstabsbalken: 20 µm

8.9. Weitere Publikationen

Im Verlauf der Promotion wurde weiterhin bei der Erstellung folgender Publikation mitgewirkt, die dort veröffentlichten Daten sind jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit:

B.R. Bonn, A. Rudolf, C. Hornbruch-Freitag, G. Daum, J. Kuckwa, L. Kastl, D. Buttgereit, R. Renkawitz-Pohl, 2013, Myosin heavy chain-like localizes at cell contact sites during *Drosophila* myoblast fusion and interacts in vitro with Rolling Pebbles 7; *Experimental Cell Research* 319:402-416

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Durch zahlreiche Tagungen, Workshops, die Betreuung von Abschlussarbeiten, die Möglichkeit zur selbstständigen Arbeit und Entwicklung eigener Ideen wurde meine persönliche Weiterentwicklung jederzeit gefördert – Danke dafür.

Prof. Dr. Monika Hassel möchte ich für die Bereitschaft zum Zweitgutachten danken.

An Dr. Detlev Buttgeriet geht ein großer Dank für unzählige Hilfestellungen, Tipps und Ratschläge sowie Fachsimpeleien und den „Streit“ um die Musikauswahl.

Den Korrekturlesern Kathi, Silke, Ina, Carina und Kaddie danke ich für die geduldige und konstruktive Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Vielen lieben Dank an Katja für zahlreiche technischen Hilfen, Abbildungen, Englisch-Korrekturen, Kaffeepausen und finnischen Metal. Du bist und bleibst die Beste.

Ein großes Dankeschön geht an Ruth, Ljubinka und Sabina für die Mikroinjektionen in abgewandelter Form, fürs immer-zur-Stelle-sein und für die offenen Ohren. Inge und Angela, vielen Dank für die ein oder andere unbeliebte Arbeit, die ihr mir abgenommen habt und die vielen ausgekratzten Flaschen.

Den aktuellen und insbesondere den ehemaligen Mitgliedern der AGs Renkawitz-Pohl, Rathke und Önel, danke ich für die vielen, fruchtbaren Diskussionen, Mittagspausen, die Geselligkeit auch außerhalb des Labors und die Feierabend-Biere. Insbesondere meine bessere Hälfte Carina, Kletter-Buddy Ina, Festival-Begleitung Lisa, die Engelchen Anja & Christina F. sowie Dream-Team Silke & Kathi haben mit mir Freude und Leid geteilt und mich bei allem unterstützt – ohne euch würde es diese Arbeit nicht geben. Meinen aktuellen Kollegen danke ich dafür, dass sie mir viel Verständnis entgegen gebracht haben und mir immer den Rücken freigehalten haben, wenn ich wieder Zeit zum Schreiben brauchte. An meine Freunde geht ein ganz großes Dankeschön dafür, dass ihr immer für mich da seid und mich mit offenen Armen empfangt, auch wenn ich mich mal wieder ewig nicht gemeldet habe. Jeder einzelne von euch bereichert mein Leben täglich.

Der größte Dank gehört meiner Familie, die mir durch ihre konsequente Unterstützung den Rückhalt gegeben hat, meinen Weg zu gehen.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Die Myoblastenfusion zur Entstehung der glatten Testismuskulatur ist abhängig von Duf und Rst wobei die embryonale Myogenese unabhängig von Argininkinase abläuft

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Jessica Kuckwa

LEBENS LAUF

Die Seiten 110 und 111 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der elektronischen Veröffentlichung.

